

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN NEUROBIOLOGIA

Tesi di Laurea:

“Modulazione dell’attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi da parte di fattori intracellulari in forme di plasticità neuronale”

Relatore:

Chiar.mo Prof. MARCELLO BRUNELLI

Candidata:

ELENA CUPISTI

Anno Accademico 2005-2006

ABBREVIAZIONI

5HT: 5-idrossitriptamina, serotonina

8-Br-cAMP: 8-Bromoadenosin-3',5'-monofosfato ciclico

AA: acido arachidonic

AHP: AfterHyperPolarization, iperpolarizzazione postuma

ATP: adenosin trifosfato

C: subunità catalitica

cAMP: adenosin-3',5'-monofosfato ciclico

DAG: diacilglicerolo

DHO: di-idro-ouabaina

DMSO: dimetilsulfossido

E.S.: errore standard

EPSP: potenziale postsinaptico eccitatorio

F: indice di Fischer

fEPSPs: potenziali postsinaptici eccitatori di campo

GABA: acido γ -aminobutirrico

gK/Ca: conduttanza K^+ , Ca^{2+} -dipendente

I_h: corrente cationica attivata dall'iperpolarizzazione

InsP₃: inositolo trifosfato

IPSP: potenziale postsinaptico inibitorio

ITF: Intermediate Term Facilitation, Facilitazione "a Intermedio Termine"

ITM: Intermediate Term Memory, Memoria "a Intermedio Termine"

K_s: canale K^+ di tipo S

KT 5720: (9S, 10S, 12R)- 2, 3, 9, 10, 11, 12- esaidro- 10 -idrossi- 9- metil- 1- osso- 9, 12- eposs- 1H- diindolo [1, 2, 3- fg: 3', 2', 1'-kl] pirrolo [3, 4-i] [1,6] benzodiazocina- 10- acido carbossilico esil estere

LTD: Long Term Depression, Depressione a Lungo Termine

LTF: Long Term Facilitation, Facilitazione a Lungo Termine

MDL 12330 A: *cis*- N- (2- fenilciclopentil)- azaciclotridec- 1- en- 2- amin idrocloride

N: nocicettiva

NMDA: acido N-metil-D-aspartato

p: probabilità

P: pressoria

PKA: protein chinasi A

PKAI: Protein Kinase A Inhibitor; 14,22-amide, permeabile alla cellula, miristoilato

PKC: protein chinasi C

R: subunità regolatrice

Rm: resistenza di membrana

Rp-8-Br-cAMPS: 8-Bromoadenosin-3',5'- monofosforotioato ciclico, isomero Rp

T: tattile

Vm: potenziale di membrana

SUMMARY

The Na^+/K^+ -ATPase activity is the main element that contributes to the genesis of the afterhyperpolarization (AHP) that accompanies the burst of action potentials in tactile sensory neurons (T cells) of the leech *Hirudo medicinalis* (Baylor and Nicholls, 1969a; Jansen and Nicholls, 1973). In T cells, AHP can be elicited by stimulating their receptive fields or by injecting intracellularly depolarizing current. Its physiological role is to produce conduction blocks in the signal transmission at the branching points along the neuritic arborizations (Baylor and Nicholls, 1969b; Van Essen, 1973; Yau, 1976; Cataldo, Brunelli, Byrne, Av-Ron, Cai and Baxter, 2005).

In the last years, it has been demonstrated that AHP amplitude can be modulated in the amplitude and this modulation is due to changes of the Na^+/K^+ -ATPase activity. In particular, there is evidence that the endogenous neurotransmitter serotonin (5HT), via cyclic AMP (cAMP), reduces the AHP amplitude, by inhibiting the phasic activation of the Na^+/K^+ -ATPase due to the sustained discharge of action potentials which generates AHP. Moreover, the 5HT is able to inhibit the Na^+/K^+ -ATPase when its activity is tonically stimulated as well as occurred during intracellular injection of Na^+ ions (Belardetti, Brunelli, Demontis and Sonetti, 1984; Catarsi and Brunelli, 1991; Catarsi, Scuri and Brunelli, 1993). On the other hand, repetitive intracellular stimulation, at constant interstimulus intervals, leads to a progressive increase of the AHP amplitude sustained by an increase of the Na^+/K^+ -ATPase phasic activity (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002) and given by an intracellular pathway mediated by 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid (AA) (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2005).

In T cells, therefore, the AHP amplitude represents a good parameter for monitoring the Na^+/K^+ -ATPase activity with an electrophysiologic approach. Besides, from the analysis of the synaptic connection between a T cell and one of its follower neurons, it has been highlighted that changes in the AHP amplitude induce a modulation of the synaptic strength between the two cells (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002; Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*). These observations suggest that the electrogenic pump is involved in phenomena of synaptic plasticity.

In this thesis, the putative role of protein kinases A (PKA) and protein kinases C (PKC) as modulators of both tonic and phasic Na^+/K^+ -ATPase activity has been analysed.

Our results show that PKA are able to exert a negative effect on the tonic activation and a positive effect on the phasic activation of the Na^+/K^+ -ATPase. Experiments of intracellular Na^+ injection have been carried out using some PKA inhibitors showing that the treated T cells exhibit a significantly greater hyperpolarization of the membrane potential (V_m) in comparison with controls (T cells treated with saline solution). This effect provides the evidence that PKA inhibition leads to an increase of the tonic Na^+/K^+ -ATPase activity, therefore, it indicates that PKA inhibit the pump tonic activity. In our model, Rp-8-Br-cAMPS is the most effective drug in inhibiting PKA. This drug has been also applied in experiments of intracellular Na^+ injection in which T cells have been preincubated with this PKA inhibitor and afterwards perfused with 5HT or 8-Br-cAMP (a cell permeable analogue of cAMP). These experiments have been carried out to clarify whether the inhibitory effects of 5HT on electrogenic pump are mediated by PKA. Interestingly, also when PKA are inhibited, 5HT is able to exert its inhibitory effects on the Na^+/K^+ -ATPase; thus suggesting that 5HT or cAMP induce their effects without activating PKA. Moreover, in T cells treated with Rp-8-Br-cAMPS, the AHP amplitude was decreased in comparison with the controls. This data suggests that PKA exert a positive modulation on the phasic activation of the Na^+/K^+ -ATPase: in fact, when inhibited, the phasic activity of the electrogenic pump is reduced.

On the contrary, using chelerytrin, a PKC inhibitor, we have detected that this protein kinases family has a facilitating action on the tonic and an inhibitory action on the phasic Na^+/K^+ -ATPase activity. In T cells treated with chelerytrin, the intracellular Na^+ injection produces a depolarization of V_m . This effect indicates that the electrogenic pump is inhibited, therefore, PKC exerts a positive modulation on the tonic activation of the pump.

Finally, T cells submitted to a repetitive stimulation, after the treatment with chelerytrin, show a significantly greater progressive increase of the AHP amplitude in comparison with the one achieved in T controls. This result suggests that PKC exerts a negative modulation on the phasic activity of Na^+/K^+ -ATPase.

RIASSUNTO

La pompa Na^+/K^+ -ATPasi è la principale componente responsabile della genesi dell'iperpolarizzazione postuma (o *afterhyperpolarization*, AHP) che accompagna la scarica dei potenziali d'azione nei neuroni sensoriali tattili (cellule T) della sanguisuga *Hirudo medicinalis* (Baylor and Nicholls, 1969a; Jansen and Nicholls, 1973). In queste cellule, la AHP può essere indotta o in seguito a stimolazione dei loro campi recettoriali o mediante iniezione intracellulare di corrente depolarizzante.

Il ruolo fisiologico della AHP è quello di creare dei blocchi di conduzione nella trasmissione dei segnali elettrici a livello dei punti di diramazione assonale dove i processi neuritici di calibro maggiore si diramano in quelli di calibro minore (*branching points*) (Baylor and Nicholls, 1969b; Van Essen, 1973; Yau, 1976; Cataldo, Brunelli, Byrne, Av-Ron, Cai and Baxter, 2005).

Negli ultimi anni, è stato messo in evidenza che la AHP può essere modulata in ampiezza sia in senso positivo che negativo e che l'entità di tale modulazione è determinata da modificazioni nell'attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi. In particolare, è stato osservato che il neurotrasmettitore endogeno serotonina (5HT), via adenosin monofosfato ciclico (cAMP), riduce l'ampiezza della AHP attraverso l'inibizione dell'attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi indotta dalla scarica sostenuta di potenziali d'azione che genera la AHP stessa. Inoltre, la 5HT è in grado di inibire la pompa di membrana anche quando la sua attività è stimolata tonicamente durante l'iniezione intracellulare di ioni Na^+ (Belardetti, Brunelli, Demontis and Sonetti, 1984; Catarsi and Brunelli, 1991; Catarsi, Scuri and Brunelli, 1993). La stimolazione intracellulare ripetuta ad intervalli costanti di tempo provoca, invece, un progressivo incremento dell'ampiezza della AHP sostenuto da un potenziamento dell'attività fasica della Na^+/K^+ -ATPasi (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002) determinato da una cascata intracellulare innescata dal Ca^{2+} che coinvolge i metaboliti della via 5-lipoossigenasica dell'acido arachidonico (AA) (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2005).

Nelle cellule T, quindi, l'ampiezza della AHP rappresenta un buon parametro per monitorare l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi con un approccio di tipo elettrofisiologico. Inoltre, analizzando l'entità della connessione sinaptica tra una cellula T e un suo neurone *follower*, è stato evidenziato che la modulazione dell'ampiezza della AHP

determina una modulazione della forza sinaptica tra le due cellule (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002; Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*). Queste osservazioni suggeriscono che l'attività della pompa elettrogenica è coinvolta in fenomeni di plasticità sinaptica.

In questa tesi, è stato analizzato l'eventuale ruolo delle protein chinasi A (PKA) e delle protein chinasi C (PKC) nella modulazione dell'attività tonica e fasica della Na^+/K^+ -ATPasi.

Dai nostri risultati è emerso che le PKA svolgono un'azione inibitoria sull'attività tonica e un'azione facilitante sull'attività fasica dell'enzima di membrana. Sono stati condotti esperimenti di iniezione intracellulare di Na^+ dopo aver preincubato le cellule con diversi inibitori delle PKA. In queste condizioni sperimentali, l'iniezione di Na^+ ha determinato un'iperpolarizzazione del potenziale di membrana (V_m) significativamente maggiore rispetto ai controlli (cellule trattate con soluzione fisiologica). Questo risultato mette in evidenza che l'inibizione delle PKA provoca un potenziamento dell'attività tonica della Na^+/K^+ -ATPasi, suggerendo che le PKA inibiscono l'attività tonica della pompa. Tra i diversi inibitori utilizzati, l'Rp-8-Br-cAMPS è risultato essere l'inibitore con maggiore efficacia. Questa sostanza è stata utilizzata anche in esperimenti in cui l'iniezione di Na^+ avveniva dopo preincubazione con l'inibitore delle PKA e successivo trattamento con 5HT o 8-Br-cAMP (analogo permeabile del cAMP). Tali esperimenti sono stati condotti al fine di chiarire se l'azione inibitoria da parte della 5HT sulla pompa elettrogenica si esplicasse attraverso l'attivazione delle PKA. È stato osservato che, anche in presenza dell'inibitore Rp-8-Br-cAMPS, la 5HT e l'analogo del cAMP sono in grado di esercitare i loro effetti inibitori sull'enzima di membrana, suggerendo che 5HT e cAMP esplicano il loro effetto modulatorio sulla pompa senza attivazione delle PKA.

Inoltre, in neuroni T trattati con Rp-8-Br-cAMPS, l'ampiezza della AHP è risultata essere ridotta rispetto a quella misurata in soluzione fisiologica. Questo dato suggerisce che le PKA esercitano una modulazione positiva sull'attività fasica della Na^+/K^+ -ATPasi: infatti, quando inibite, l'attività fasica della pompa elettrogenica risulta ridotta.

Infine, utilizzando l'inibitore delle PKC cheleritrina, è stato evidenziato che questa famiglia di protein chinasi ha un'azione facilitante sull'attività tonica e un'azione inibitoria sull'attività fasica della Na^+/K^+ -ATPasi. In cellule T trattate con cheleritrina, la depolarizzazione del V_m che si ha durante l'iniezione intracellulare di Na^+ indica che la pompa elettrogenica è inibita e, quindi, che le PKC modulano positivamente l'attività tonica dell'enzima. In cellule sottoposte ad un protocollo di stimolazione ripetuta ad intervalli costanti di tempo, dopo trattamento con cheleritrina, il progressivo incremento dell'ampiezza della AHP è risultato significativamente maggiore rispetto a quello ottenuto in soluzione fisiologica. Ciò suggerisce che le PKC esercitano una modulazione negativa sull'attività fasica della Na^+/K^+ -ATPasi.

INDICE

INTRODUZIONE.....	pag. 1
La Na^+/K^+ -ATPasi e i fenomeni di plasticità sinaptica	pag. 3
Il modello sperimentale: <i>Hirudo medicinalis</i>	pag. 7
Le cellule sensoriali T.....	pag. 11
Il fenomeno elettrofisiologico della AHP.....	pag. 14
PKA e PKC e plasticità sinaptica	pag. 21
SCOPO della TESI.....	pag. 26
MATERIALI e METODI	pag. 28
Animali	pag. 28
Soluzioni.....	pag. 29
Registrazioni elettrofisiologiche.....	pag. 29
Raccolta dati e analisi statistica	pag. 32
RISULTATI	pag. 33
Effetti dell'iniezione di Na^+ dopo trattamento con.....	pag. 33
diversi inibitori delle PKA	
Effetti dell'iniezione di Na^+ dopo trattamento con	pag. 36
Rp-8-Br-cAMPS e 5HT e 8-Br-cAMP	
Effetti dell'Rp-8-Br-cAMPS sull'attivazione.....	pag. 38
fasica della Na^+/K^+ -ATPasi	
Effetto dell'iniezione di Na^+ dopo trattamento con.....	pag. 40
cheleritrina	
Effetto della cheleritrina sull'attivazione fasica della	pag. 42
Na^+/K^+ -ATPasi in seguito a stimolazione ripetuta	
DISCUSSIONE.....	pag. 44
CONCLUSIONI.....	pag. 49
BIBLIOGRAFIA	pag. 51

INTRODUZIONE

Numerosi studi condotti in questi ultimi anni, sia nei Vertebrati che negli Invertebrati, attribuiscono alla pompa Na^+/K^+ -ATPasi un ruolo importante in forme di plasticità sinaptica.

In particolare, nei neuroni sensoriali T della sanguisuga *Hirudo medicinalis* (*H. medicinalis*) sono stati individuati eventi di plasticità sinaptica correlati a modificazioni dell'attività dell'enzima Na^+/K^+ -ATPasi. Queste cellule rappresentano un buon modello cellulare per monitorare l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi con un approccio di tipo elettrofisiologico in quanto presentano, nel loro profilo di scarica, un'iperpolarizzazione postuma (AHP) che è prevalentemente sostenuta dall'attività della pompa elettrogenica. La AHP è una deflessione in senso iperpolarizzante del potenziale di membrana che segue la scarica di potenziali d'azione indotta, fisiologicamente, dalla stimolazione dei campi recettoriali di questi neuroni sensoriali, o, sperimentalmente, dall'iniezione intracellulare di treni di impulsi depolarizzanti.

In passato, è stato messo in evidenza che l'ampiezza della AHP può essere modulata e che questa modulazione dipende dall'attività della Na^+/K^+ -ATPasi. La serotonina (5HT), via adenosin monofosfato ciclico (cAMP), determina l'inibizione della pompa di membrana che si traduce nella riduzione dell'ampiezza della AHP (Belardetti, Brunelli, Demontis and Sonetti, 1984; Catarsi, Scuri and Brunelli, 1993). D'altra parte, la stimolazione intracellulare ripetuta della cellula T ad intervalli costanti di tempo, induce un aumento dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi che provoca un progressivo incremento dell'ampiezza della AHP. Il meccanismo molecolare alla base di tale fenomeno è innescato dall'aumento intracellulare della concentrazione di Ca^{2+} ed è mediato dai metaboliti della via 5-lipoossigenasica dell'acido arachidonico (AA), i quali agirebbero sulla pompa elettrogenica, con un meccanismo che non è ancora chiarito nei dettagli (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2005).

Recentemente, è stato osservato che l'aumento dell'ampiezza della AHP porta a depressione sinaptica (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002) mentre la riduzione dell'ampiezza della AHP determina un incremento del potenziale postinaptico (Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*).

Questi dati concorrono ad attribuire alla Na^+/K^+ -ATPasi un ruolo centrale nei meccanismi alla base di modificazioni plastiche e rendono interessante approfondire il ruolo che vie intracellulari legate ai secondi messaggeri, quali il cAMP e il Ca^{2+} , possono avere in questi eventi.

In questa tesi è stata analizzata la possibilità che fattori intracellulari, quali le protein chinasi A (PKA) e le protein chinasi C (PKC), modulino l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi nelle cellule T di *H. medicinalis*.

La Na^+/K^+ -ATPasi e i fenomeni di plasticità sinaptica

L'enzima Na^+/K^+ -ATPasi ha la principale funzione di trasportare attivamente ed elettrogenicamente ioni Na^+ e K^+ attraverso la membrana plasmatica e, quindi, di mantenere i gradienti ionici fondamentali per l'elettrogenesi nelle cellule eccitabili.

È una proteina tetramerica composta da due subunità α e due subunità β . La subunità α presenta i siti di legame per Na^+ e ATP sulla sua superficie intracellulare e i siti di legame per K^+ e per i glicosidi cardioattivi (sostanze che inibiscono l'attività dell'enzima) sulla sua superficie extracellulare. La subunità β non ha funzione di trasporto ionico, ma sembra essere importante per il trasferimento e il mantenimento della subunità α nella membrana. L'accumulo intracellulare di Na^+ rappresenta il principale stimolo che attiva la Na^+/K^+ -ATPasi che genera una corrente netta uscente attraverso la membrana trasportando 3 Na^+ all'esterno e 2 K^+ all'interno della cellula. In questo modo, l'attività dell'enzima Na^+ -indotta, può generare un'iperpolarizzazione del voltaggio di membrana che, in molte cellule eccitabili, contribuisce alla genesi di quei fenomeni elettrofisiologici che vanno sotto il nome di AHP e che giocano un ruolo importante nella regolazione dell'eccitabilità neuronale. Oltre a questa fondamentale funzione, la Na^+/K^+ -ATPasi contribuisce alla regolazione del volume cellulare, del pH e dei livelli di Ca^{2+} , e guida una serie di processi di trasporto secondario (ad esempio, il trasporto di glucosio).

Ad accrescere l'importanza della Na^+/K^+ -ATPasi, nella fisiologia del sistema nervoso, concorrono numerosi studi, condotti negli ultimi anni, in cui alla pompa Na^+/K^+ -ATPasi è stato attribuito un ruolo importante in forme di plasticità sinaptica sia nei Vertebrati che negli Invertebrati.

Ad esempio, è stato messo in evidenza che l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi contribuisce al mantenimento dell'apprendimento spaziale nei ratti (Zhan, Tada, Nakazato, Tanara and Hondo, 2004). Gli animali che avevano subito per una settimana la somministrazione intraventricolare, per mezzo di una pompa osmotica, di ouabaina (bloccante irreversibile della pompa Na^+/K^+ -ATPasi), che determinava un blocco dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi nelle cellule dell'aracnoide, presentavano disturbi transienti dell'apprendimento spaziale quando sottoposti ai tests con Water Maze Task.

Recentemente, nei Vertebrati, è stata ipotizzata l'esistenza di una forma di *Long Term Depression* (LTD) indotta dalla di-idro-ouabaina (DHO), un analogo ad azione reversibile della ouabaina (Reich, Mason and Alger, 2004). Il trattamento di *slices* di ippocampo con DHO a basse concentrazioni influenza l'efficacia sinaptica: si ha soppressione dei potenziali postsinaptici eccitatori di campo (fEPSPs) che persiste per tutto il periodo di applicazione della sostanza e recupera parzialmente dopo 2 ore di lavaggio. La LTD può essere indotta mediante stimolazione tetanica a bassa frequenza o con l'applicazione di agonisti dei recettori del glutammato sia metabotropici che di tipo NMDA. La depressione sinaptica indotta dalla DHO sarebbe simile a quella che si ottiene in seguito a stimolazioni elettriche, ma non è influenzata dal blocco dei recettori glutammatergici metabotropici e NMDA. Quindi, si tratterebbe di una nuova forma di plasticità sinaptica a lungo termine dovuta all'inibizione dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi.

In un recente studio, è stata evidenziata, nell'ippocampo di ratti immaturi, una forma di depressione sinaptica a breve termine attività-dipendente: la stimolazione alla frequenza di 10Hz delle collaterali di Schaffer provoca iperpolarizzazione di membrana che rende le cellule del campo CA3 silenti (Muños-Cuevaz, Vara and Colino, 2004). Anche in questa forma di depressione sinaptica sembra essere coinvolta la Na^+/K^+ -ATPasi; infatti, bloccando la pompa con ouabaina, l'iperpolarizzazione viene meno e le cellule del campo CA3 sono di nuovo in grado di scaricare.

Altre evidenze del coinvolgimento dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi in fenomeni di plasticità sinaptica derivano da un altro studio sull'ippocampo di ratto (Wyse, Bavaresco, Reis, Zugno, Tegliari, Calcagnotto and Netto, 2004). È stata saggiata l'attività della pompa in neuroni ippocampali di ratti addestrati con un "test di evitamento" in cui imparavano ad evitare una piattaforma su cui potevano ricevere *shocks*. Immediatamente dopo il termine dell'addestramento, e dopo 6 ore, l'attività della pompa di membrana era notevolmente ridotta e tornava ai livelli basali dopo 24 ore. In ratti che venivano posti solo una volta sulla piattaforma, e quindi ricevevano un solo *shock*, la riduzione dell'attività dell'enzima era evidente soltanto subito dopo l'applicazione dello *shock*. Questi risultati suggeriscono che la Na^+/K^+ -ATPasi

potrebbe essere coinvolta in meccanismi di memoria a breve termine o in meccanismi di consolidamento.

Ancora studiando l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi a livello dei neuroni ippocampali di ratto, alcuni Autori hanno dimostrato che la modulazione dell'attività della pompa potrebbe essere un meccanismo d'azione del Li^+ nel trattamento dei disordini affettivi (de Vasconcellos, Zugno, Dos Santos, Nietto, Crema, Gonçalves, Franzon, Wyse, Da Rocha and Dalmaz, 2005). Nell'ippocampo di ratti sottoposti ad un modello sperimentale di depressione, infatti, si ha una ridotta attività della Na^+/K^+ -ATPasi e un peggioramento della memoria spaziale, testata con il Water Maze Task. Il trattamento cronico con sali di Li^+ (largamente utilizzati nel trattamento dei disordini affettivi), oltre a migliorare le *performances* in Water Maze, determina un'aumentata attività della pompa di membrana.

Nel gambero, a livello della giunzione neuromuscolare, è stato osservato invece che la pompa elettrogenica è essenziale per l'instaurarsi di una *Long Term Facilitation* (LTF) indotta dalla stimolazione ad alta frequenza del motoneurone. Tale stimolazione produrrebbe un'entrata massiccia di Na^+ che attiverebbe la Na^+/K^+ -ATPasi provocando l'iperpolarizzazione del potenziale di membrana e l'apertura di canali cationici I_h (attivati dall'iperpolarizzazione) i quali, in ultima analisi, determinerebbero LTF (Beaumont, Zhong, Froemke, Ball and Zucker, 2002).

Anche nella sanguisuga *H. medicinalis* è stato recentemente evidenziato un importante ruolo della Na^+/K^+ -ATPasi in meccanismi di modulazione dell'attività neuronale. Ad esempio, saggiando l'effetto del neuropeptide endogeno miomodulina sull'attività degli interneuroni che generano il ritmo cardiaco, è stato osservato che l'applicazione di questa sostanza su gangli isolati contenenti tali interneuroni porta alla diminuzione del periodo dei *bursts* e all'incremento della frequenza degli *spikes* all'interno dei *bursts*. Da registrazioni elettrofisiologiche, condotte in voltage- e current-clamp, è risultato che la miomodulina determina questi effetti sulle caratteristiche di *burst* aumentando la corrente cationica I_h e inibendo l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi (Tobin and Calabrese, 2005).

Inoltre, nelle cellule meccanocetttrici T di *H. medicinalis*, la modulazione dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi si è dimostrata alla base di fenomeni di plasticità sinaptica correlati alla modulazione della AHP (vedi oltre) che accompagna la scarica dei

potenziali d'azione in queste cellule sensoriali (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002; Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*).

Il modello sperimentale: *Hirudo medicinalis*

La sanguisuga *H. medicinalis* rappresenta un buon modello animale per studiare vari aspetti del sistema nervoso con approccio sperimentale di tipo elettrofisiologico, comportamentale e biomolecolare.

È un Invertebrato che offre diversi vantaggi sperimentali: presenta un sistema nervoso semplice con un numero limitato di cellule di dimensioni tali da essere agevolmente registrate elettrofisiologicamente a livello intracellulare; le strutture nervose sono facilmente estraibili e si mantengono in buone condizioni per lungo tempo. Inoltre, è possibile individuare, in dettaglio, reti neurali relativamente semplici che sottendono ad atti comportamentali piuttosto complessi.

H. medicinalis è un anellide che appartiene alla famiglia *Hirudinidae*. Come tutti gli anellidi, questo animale presenta un'organizzazione metamerica del corpo e il sistema nervoso rispecchia tale organizzazione (**Fig. 1**). È costituito da una catena di 21 gangli segmentali connessi ad una massa gangliare cefalica e ad una massa gangliare caudale. I gangli sono numerati a partire dalla massa gangliare cefalica e ogni ganglio innerva un segmento rostro-caudale del corpo.

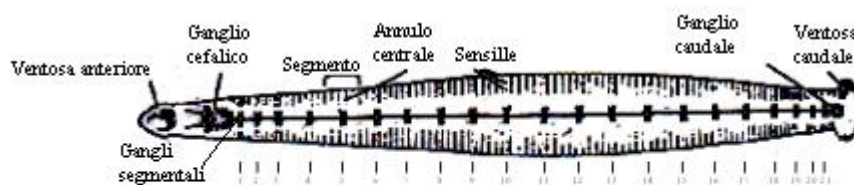


Fig. 1: Schema del sistema nervoso gangliare della sanguisuga *Hirudo medicinalis* (modificato da: Kuffler S.W. and Nicholls J.G. "From neuron to brain", Sinauer Ass. Inc. Publisher, USA, 1976).

La massa cefalica è localizzata all'estremità anteriore della catena e va ad innervare la ventosa anteriore, specializzata nella suzione del sangue dall'ospite. È costituita, dorsalmente, dalla fusione del cingolo periesofageo con il ganglio sopraesofageo, e, ventralmente, dalla coalescenza di 4 gangli segmentali. La massa caudale, che deriva dalla fusione di 7 gangli segmentali, innerva l'estremità posteriore del corpo.

dell'animale e la ventosa caudale. Quest'ultima è deputata all'ancoraggio dell'animale su substrato solido durante il movimento di *crawling*.

La catena gangliare decorre per tutta la lunghezza del corpo dell'animale in posizione ventrale e mediale; è avvolta da tessuto connettivo e contenuta nel seno venoso ventrale (**Fig. 2**).

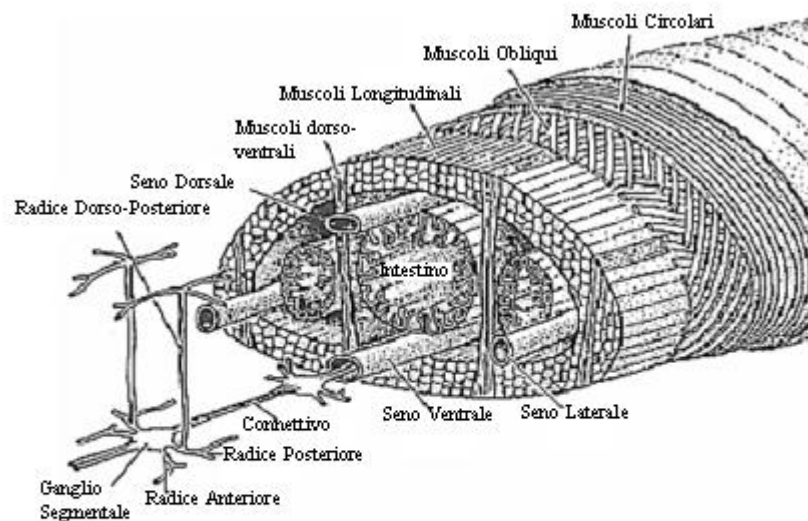


Fig. 2: Schema tridimensionale della sezione trasversale della sanguisuga. Sono evidenti la corda nervosa, le radici laterali dei gangli segmentali e la loro relazione con le altre strutture del corpo (modificato da: Muller, Nicholls and Stent, "Neurobiology of the leech" Cold Spring Harbor Laboratory, 1981).

I gangli segmentali hanno un aspetto rotondeggiante e contengono circa 400 neuroni. Come già accennato, rispecchiano la metameria del corpo per cui la loro morfologia è mantenuta inalterata per tutta la lunghezza della catena gangliare ad eccezione del 5° e del 6° ganglio. Quest'ultimi presentano un numero maggiore di neuroni (oltre 700) poiché contengono anche cellule preposte all'innervazione degli organi sessuali (Macagno, 1980).

All'interno di ogni ganglio i neuroni sono raggruppati in sei compartimenti follicolari, o pacchetti, ognuno dei quali è costituito dai prolungamenti di una cellula gliale che avvolge i pirenofori. Guardando un ganglio dal lato ventrale (**Fig. 3**), è possibile individuare: 4 pacchetti laterali (2 in posizione anteriore e 2 in posizione posteriore) e

2 pacchetti, rispettivamente, antero- e postero-mediali. I neuriti dei neuroni contenuti nel ganglio raggiungono i gangli adiacenti attraverso il connettivo intergangliare, e la periferia attraverso 4 radici laterali disposte, due per lato, simmetricamente rispetto al ganglio.

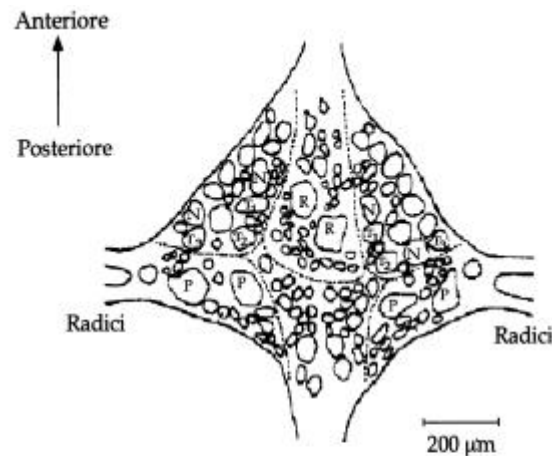


Fig. 3: Schema del lato ventrale di un ganglio segmentale. Sono evidenti i neuroni sensoriali T, P e N e le cellule serotoninergiche di Retzius (R) (modificato da: Muller, Nicholls and Stent, "Neurobiology of the leech", Cold Spring Harbor Laboratory, 1981).

In un ganglio segmentale è riconoscibile un numero ben determinato di neuroni motori, sensoriali e interneuroni che sono organizzati in reti neurali che sottendono tutti gli atti comportamentali che l'animale esibisce.

Sono presenti neuroni serotoninergici, in numero che varia da 7 a 9. Tra questi, sono particolarmente distinguibili 2 cellule con un diametro di circa 80 μM : le cellule giganti di Retzius. Esse producono 5HT che regola la produzione di muco da parte della cute (Lent, 1973), determina il rilassamento di lunga durata dei muscoli longitudinali del corpo (Mason, Sunderland and Leake, 1979) e lo stato di allerta dell'animale (Kristan, 1983). Queste due cellule sono interconnesse tra di loro da sinapsi elettriche (Hagiwara and Morita, 1962; Eckert, 1963) che sono modulate in senso disaccoppiante da 5HT e dopamina (Colombaioni and Brunelli, 1988).

Ogni ganglio ha 34 motoneuroni. Particolarmente studiati sono quelli responsabili della contrazione muscolare durante il nuoto e il motoneurone L. Questo si trova sul lato dorsale del ganglio e innerva la muscolatura longitudinale che si contrae quando l'animale accorcia il corpo (*shortening*).

Le fibre che decorrono nei connettivi intergangliari appartengono a interneuroni di conduzione che connettono cellule di gangli adiacenti. Gli interneuroni S, per esempio, costituiscono il “sistema a rapida conduzione” che permette all'impulso di propagarsi velocemente per tutta la catena gangliare tramite sinapsi elettriche non rettificanti tra i neuroni di ogni ganglio.

Infine, sono presenti tre diverse tipologie di neuroni sensoriali meccanocettivi che veicolano tre differenti modalità di stimolazione. In tutto, ci sono 14 cellule sensoriali per ganglio, distinguibili dal lato ventrale:

- 6 cellule T (tre per ogni pacchetto antero-laterale), denominate T₁, T₂ e T₃, che rispondono a lievi stimoli tattili applicati alla cute dell'animale;
- 4 cellule P (due per ogni pacchetto postero-laterale), che si attivano in seguito a stimoli pressori;
- 4 cellule N (due per ogni pacchetto antero-laterale), che rispondono a stimoli di natura nocicettiva

(Baylors and Nicholls, 1969a; Van Essen, 1973).

Le cellule sensoriali T

Le cellule T sono neuroni sensoriali che rispondono a stimoli tattili di lieve intensità provenienti dalla cute; sono state oggetto di numerosi studi poiché costituiscono una via sensoriale essenziale per l'induzione di molti atti comportamentali. Quindi, nel corso degli anni, è stato caratterizzato il loro profilo di scarica e sono stati messi in evidenza eventi modulatori della trasmissione degli impulsi lungo il loro albero neuritico (Baylor and Nicholls, 1969b; Van Essen, 1973; Baccus, 1998; Cataldo, Brunelli, Byrne, Av-Ron, Cai and Baxter, 2005).

Presentano un particolare profilo di scarica caratterizzato da una serie di potenziali d'azione a cui è associata una deflessione del potenziale di membrana in senso iperpolarizzante (AHP). Questa è sostenuta prevalentemente dall'attività della Na^+/K^+ -ATPasi e, in minor misura, da una conduttanza $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dipendente (Jansen and Nicholls, 1973; Van Essen, 1973).

Le cellule T sono neuroni unipolari che presentano un albero neuritico ben ramificato e, all'interno del ganglio, sono disposte simmetricamente: 3 nel pacchetto laterale di destra e 3 nel pacchetto laterale di sinistra (**Fig. 3**). È possibile distinguere, in ciascun lato, tre diversi sottotipi di cellula T in base alla localizzazione del loro campo recettoriale. Vengono quindi denominate diversamente: le cellule T_1 innervano la zona ventrale della cute, le T_2 hanno diramazioni nella zona laterale e le T_3 innervano la porzione di cute dorsale.

Le cellule T_1 e T_2 , in seguito ad una stimolazione tattile, rispondono con un treno di potenziali d'azione; le cellule T_3 , invece, scaricano un singolo potenziale d'azione. Oltre che elettrofisiologicamente, le cellule T_1 e T_2 si assomigliano anche nell'organizzazione delle ramificazioni neuritiche; mentre, le cellule T_3 , si distinguono anche per questo aspetto (Yau, 1976). Queste ultime presentano una singola diramazione nel ganglio in cui si trova il loro corpo cellulare che raggiunge la periferia attraverso la radice laterale posteriore; altre due ramificazioni raggiungono i gangli adiacenti: sia il neurite che arriva al ganglio anteriore che il neurite che raggiunge il ganglio posteriore decorrono verso la periferia attraverso la radice posteriore. Le cellule T_1 e T_2 hanno un assone principale da cui si dipartono due ramificazioni che decorrono lungo il connettivo intergangliare. Una di queste raggiunge il ganglio adiacente anteriore e da qui arriva in periferia attraverso le due

radici laterali. L'altra diramazione, a sua volta, dà origine a due neuriti sottili che raggiungono la periferia attraverso le radici laterali del ganglio in cui è contenuto il soma della cellula e ad un neurite che raggiunge il ganglio posteriore e arriva in periferia attraverso la radice laterale anteriore (**Fig. 4**).

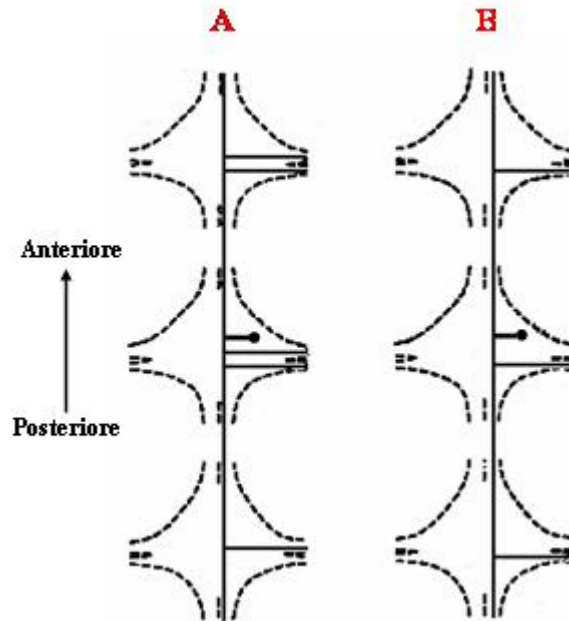


Fig. 4: Schema delle ramificazioni neuritiche delle cellule T. **A:** schema delle ramificazioni di una cellula del tipo T_1 o T_2 . **B:** schema delle ramificazioni di una cellula T_1 (modificato da: Yau, *J. Physiol.*, 263: 513-38, 1976).

Tutti i contatti sinaptici tra neuriti, principalmente di tipo asso-assonico, avvengono nella zona centrale del ganglio (Coggeshall and Fawcett, 1964), detta neuropilo. Ogni cellula T è in grado di attivare altre 11 cellule T: gli altri 5 neuroni T nello stesso ganglio e le 6 cellule T omolaterali che si trovano nei gangli adiacenti anteriore e posteriore.

L'attivazione delle 8 cellule T ipsilaterali sembra essere diretta (Baylor and Nicholls, 1969a), mentre, l'eccitazione delle 3 cellule T controlaterali pare essere mediata da un interneurone inibitorio.

Le connessioni sinaptiche tra i neuroni T sono sia di tipo elettrico che chimico. Le sinapsi elettriche sono di tipo asso-assonico e sono state, nel corso degli anni, oggetto di molti studi. In particolare, è emerso che gli impulsi depolarizzanti attraversano la connessione in entrambi i sensi, mentre quelli iperpolarizzanti non attraversano la sinapsi (doppia rettificazione). Questo avviene a livello sia delle connessioni tra cellule dello stesso ganglio sia delle connessioni tra cellule di gangli adiacenti (Baylor and Nicholls, 1969b; Acklin, 1988).

Il potenziale d'azione che nasce in una cellula T porta, in un'altra cellula T, ad una rapida depolarizzazione, senza ritardo sinaptico (con una latenza inferiore a 0,5 msec), che spesso giunge a soglia e a cui fanno seguito un potenziale post-sinaptico depolarizzante (EPSP) a più lunga latenza, e un potenziale post-sinaptico iperpolarizzante (IPSP). Grazie ad esperimenti condotti in presenza di $MgCl_2$ 20 mM (inibitore delle sinapsi chimiche) è stato possibile mettere in evidenza che la depolarizzazione rapida che si instaura dipende dall'accoppiamento elettrico (Nicholls and Purves, 1970). Infatti, in queste condizioni sperimentali, la rapida depolarizzazione permane, mentre scompaiono sia l'EPSP che l'IPSP di natura chimica. Quest'ultimo è dovuto ad una conduttanza Cl^- attivata da un interneurone inibitorio comune alle tre cellule T di uno stesso pacchetto del ganglio (Baylor and Nicholls, 1969a); della componente chimica di natura eccitatoria che connette tra loro queste cellule, c'è ancora molto da chiarire. Baylor e Nicholls (1969a) hanno ipotizzato che siano, contrariamente alle sinapsi elettriche, di-sinaptiche o polisinaptiche.

Muller e McMahan (1976) hanno individuato, con tecniche di microscopia elettronica, delle varicosità lungo le terminazioni secondarie e terziarie che potevano essere sede di sinapsi chimiche sia pre- che post-sinaptiche.

Poco si conosce riguardo la natura del neurotrasmettitore rilasciato dai neuroni T sui recettori espressi a livello postsinaptico.

Il fenomeno elettrofisiologico della AHP

La AHP caratterizza il profilo di scarica delle cellule sensoriali T della sanguisuga *H. medicinalis*.

Questa caratteristica elettrofisiologica è presente in molti tipi di cellula nervosa sia di Invertebrato che di Vertebrato. Caratterizza, ad esempio, l'attività elettrica dei recettori da stiramento nei crostacei (Nakajima and Takahashi, 1966) e delle cellule nervose di *Helix* (Kerkut and Thomas, 1965). Nel ratto, i motoneuroni del nucleo dorsale del vago (Sah and McLachan, 1992), i neuroni neostriatali (Pineda, Gallaraga, Bargas, Cristancho and Aceves, 1992) e le cellule piramidali dell'ippocampo (Storm, 1987; Storm, 1989; Williamson and Alger, 1990) presentano iperpolarizzazione sia dopo singolo potenziale d'azione, sia dopo un treno di potenziali d'azione.

Due sono le principali componenti responsabili della genesi di questo fenomeno: una componente precoce e una tardiva. La componente precoce è dovuta prevalentemente all'attivazione di correnti K^+ voltaggio-dipendenti. La componente tardiva della AHP è dovuta all'attivazione di conduttanze K^+/Ca^{2+} -dipendenti più lente, che sono attivate dall'entrata di Ca^{2+} durante il potenziale d'azione (Gustafsson, 1974; Hill, Arhem and Grillner, 1985; Sah, 1996). In molti tipi neuronali, è presente un'altra componente responsabile della genesi della AHP: la Na^+/K^+ -ATPasi. Dopo una sostenuta scarica di potenziali d'azione, i cambiamenti della distribuzione ionica che ne risultano determinano un aumento dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi che si traduce, a livello elettrofisiologico, in un'iperpolarizzazione postuma del potenziale di membrana che può persistere per parecchi secondi. L'implicazione della Na^+/K^+ -ATPasi nella genesi della AHP è stata descritta negli assoni amielinici dei mammiferi (Den Hertog and Ritchie, 1969), nei meccanocettori di insetto (French, 1989), nei terminali dei motoneuroni di lucertola (Morita, David, Barrett and Barrett, 1993), nei neuroni sensoriali della lampreda (Parker, Hill and Grillner, 1996) e nei recettori olfattivi di aragosta (Corotto and Michel, 1998).

In tutti i meccanocettori di *H. medicinalis* è presente la AHP ed è determinata da due componenti: l'attivazione di una conduttanza K^+/Ca^{2+} -dipendente (gK/Ca) e l'incremento della attività della Na^+/K^+ -ATPasi. In particolare: nelle cellule N la componente principale è la gK/Ca ; nelle cellule P entrambe le componenti sono

coinvolte in ugual misura e nelle cellule T, la AHP è sostenuta prevalentemente dall'azione della Na^+/K^+ -ATPasi e parzialmente, per circa il 20-25%, dalla gK/Ca (Jansen and Nicholls, 1973; Van Essen, 1973).

La AHP, insieme alla geometria del neurone, può essere considerata un meccanismo di modulazione della conduzione dell'impulso lungo l'albero neuritico della cellula. Un albero neuritico estremamente ramificato e la modulazione di un parametro elettrofisiologico come la AHP possono rappresentare un filtro per la trasmissione delle informazioni lungo i prolungamenti della cellula nervosa. Nelle cellule T, è stato dimostrato che la AHP crea, in una via precedentemente attivata, dei blocchi di conduzione nei punti di diramazione assonale dove i processi neuritici di calibro minore convergono in quelli di calibro maggiore (*branching points*). Una conseguenza di ciò è che i potenziali d'azione evocati in periferia possono non raggiungere il soma della cellula T, perché non sono in grado di propagarsi oltre il *branching point* (Baylor and Nicholls, 1969b; Van Essen, 1973; Yau, 1976) e i potenziali d'azione che si propagano dal soma verso i terminali sinaptici possono essere bloccati in funzione della frequenza di scarica e della morfologia dei terminali (Lombardo, Scuri, Cataldo, Calvani, Nicolai, Mosconi and Brunelli, 2004; Cataldo, Brunelli, Byrne, Av-Ron, Cai and Baxter, 2005).

Quindi, la AHP può indurre alterazioni della configurazione dei potenziali d'azione, può determinare un innalzamento della soglia di attivazione della cellula e provocare inversione dei potenziali sinaptici oppure influenzare la quantità di trasmettitore rilasciato dai terminali sinaptici.

Nelle cellule T, la stimolazione meccanica del loro campo recettoriale, o l'iniezione intracellulare di un treno di impulsi depolarizzanti (200 msec, 2,5 Hz), della durata complessiva di 3 secondi (intensità di corrente fra 0,4 e 0,8 nA), produce una AHP che dura per diversi secondi (**Fig. 5**). Maggiore è la durata della scarica, più ampia e duratura risulta essere la AHP.

Nei nostri laboratori è stato dimostrato che l'ampiezza della AHP è modulabile e che tale modulazione è strettamente legata alla modulazione dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi.

L'ampiezza della AHP può essere modulata in senso negativo da parte del neurotrasmettitore endogeno 5HT. Sia la somministrazione di questa monoammina

che la stimolazione delle cellule serotoninergiche di Retzius determinano una netta riduzione dell'ampiezza della AHP (Belardetti, Brunelli, Demontis and Sonetti, 1984). L'effetto della 5HT è reversibile, dose-dipendente ed è bloccato dalla metisergide, un bloccante generico dei recettori serotoninergici (Belardetti, Brunelli, Demontis and Sonetti, 1984).

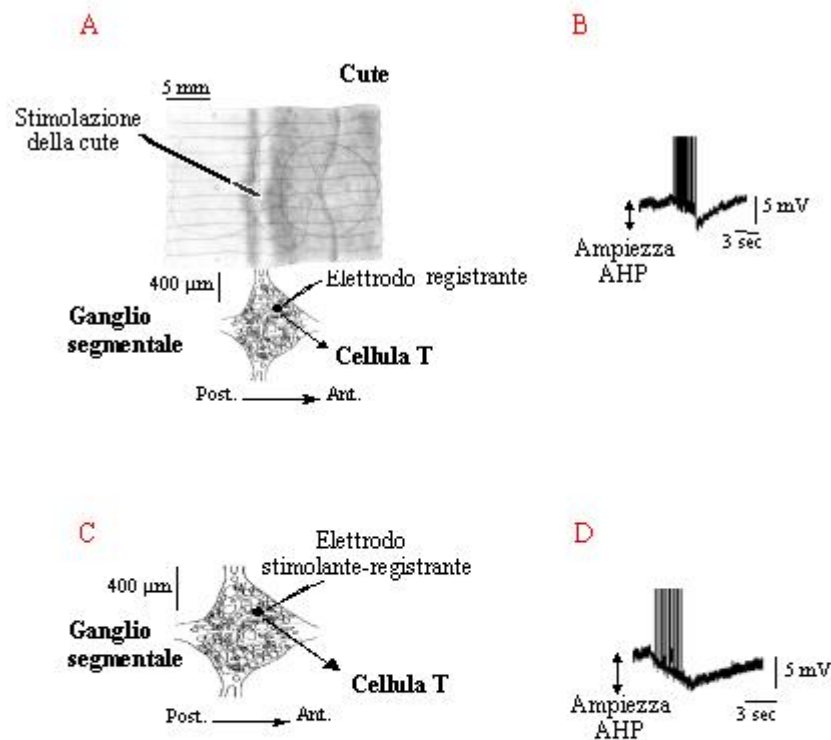


Fig. 5: Induzione della AHP. **A:** Stimolazione del campo recettoriale di una cellula il cui soma è stato penetrato con un elettrodo registrante. **B:** Profilo di scarica registrato dal soma della cellula caratterizzato da una AHP. **C:** Iniezione intracellulare di un treno di impulsi depolarizzanti della durata di 3 sec. **D:** AHP registrata in seguito a stimolazione intracellulare (modificata da: Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, *J. Neurophysiol.*, 88: 2490-500, 2002).

Alla concentrazione di 50 μM, la 5HT produce una riduzione dell'ampiezza della AHP di circa l'80% che non si ha quando la cellula è trattata con 5HT e metisergide (Fig. 6).

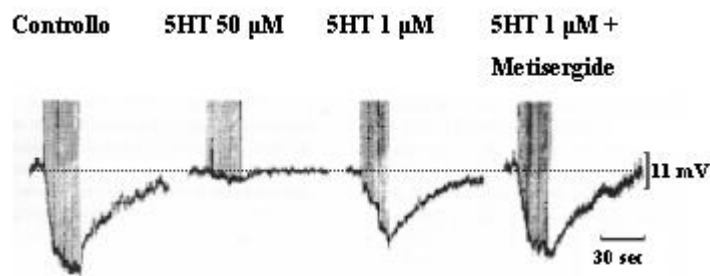


Fig. 6: Effetto della somministrazione della 5HT e del bloccante generico dei recettori serotoninergici, metisergide, sull'ampiezza della AHP. La 5HT determina una riduzione dell'ampiezza della AHP dose-dipendente. Tale effetto è bloccato dalla metisergide (modificata da: Belardetti, Brunelli, Demontis and Sonetti, *Brain Res.*, 300: 91-102, 1984).

A livello cellulare è stato osservato, con esperimenti di tipo elettrofisiologico, che la 5HT esplica i suoi effetti attraverso il cAMP (Catarsi, Scuri and Brunelli, 1993). Infatti, la 5HT, alla concentrazione di 50 µM, non è in grado di ridurre l'ampiezza della AHP in presenza di MDL 12330 A, bloccante dell'adenilato ciclasi; mentre, l'iniezione intracellulare di cAMP induce riduzione della AHP. La 5HT, quindi, si legherebbe al suo recettore di membrana, attiverebbe l'adenilato ciclasi, che determina un aumento intracellulare di cAMP, e questo porterebbe all'inibizione della Na^+/K^+ -ATPasi e alla conseguente riduzione dell'ampiezza della AHP, con meccanismi che devono ancora essere descritti in dettaglio e che, in parte, vengono affrontati nel presente studio (Catarsi and Brunelli, 1991).

L'ampiezza della AHP può essere modulata anche in senso positivo. Scuri, Mozzachiodi e Brunelli (2002) hanno evidenziato un meccanismo di modulazione attività-dipendente.

Stimolando la cellula ripetutamente, ad intervalli di tempo costanti, sia con iniezioni di treni di impulsi depolarizzanti, che inducono una AHP, sia con stimolazioni meccaniche del suo campo recettoriale si ha un progressivo incremento dell'ampiezza della AHP che permane anche fino a dieci minuti dopo il termine della stimolazione (Fig. 7).

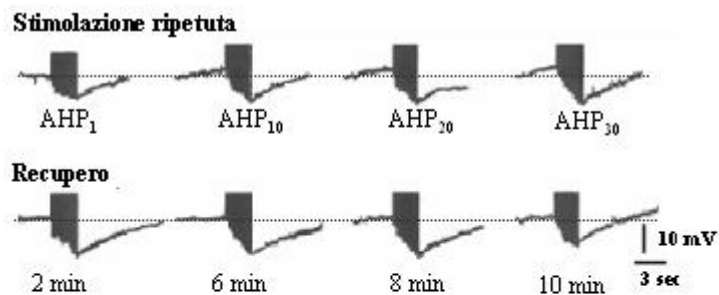


Fig. 7: Effetto della stimolazione ripetuta della cellula T con 30 treni di impulsi depolarizzanti della durata di 3 sec sull'ampiezza della AHP. Sono mostrate le AHPs ottenute dopo il 1°, 10°, 20° e 30° treno di impulsi. Si noti il progressivo aumento dell'ampiezza della AHP. L'ampiezza della AHP recupera il suo valore iniziale dopo circa 10 min dal termine della stimolazione ripetuta (modificata da: Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, *J. Neurophysiol.*, 88: 2490-500, 2002).

Il potenziamento della AHP è dovuto ad un incremento dell'attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi.

Con esperimenti elettrofisiologici in cui sono stati utilizzati vari bloccanti, è stato possibile definire, anche se ancora non completamente, la cascata intracellulare che sottende al potenziamento dell'ampiezza della AHP. È stata identificata una particolare via di metabolizzazione dell'AA, attivata dall'entrata di Ca^{2+} nella cellula. L'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]$ nel citoplasma, dovuta sia all'entrata dello ione attraverso canali Ca^{2+} -voltaggio dipendenti e nifedipina sensibili, sia al suo rilascio dai compartimenti intracellulari (promossa da Ca^{2+}), determina l'attivazione della fosfolipasi A_2 che scinde l'AA dai fosfolipidi di membrana. L'AA viene metabolizzato attraverso la via metabolica 5-lipoossigenasica. I prodotti di questa via metabolica sarebbero in grado di agire (anche se ancora non è chiaro attraverso quali meccanismi molecolari) sulla pompa Na^+/K^+ -ATPasi potenziandone l'attività e inducendo il progressivo incremento dell'ampiezza della AHP che si osserva durante la stimolazione ripetuta (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2005). In questo meccanismo intracellulare, un ruolo importante è rivestito dal rilascio dagli *stores* citoplasmatici di Ca^{2+} indotto da Ca^{2+} , perché esso rende l'incremento dell'attività

della pompa, e quindi il corrispondente incremento dell'ampiezza della AHP, duraturo nel tempo.

Pertanto, da queste evidenze sperimentali, risulta che la AHP, nei neuroni T di *H. medicinalis*, dipende dall'attività della Na^+/K^+ -ATPasi sia nella genesi che nella modulazione positiva e negativa della sua ampiezza.

Studi recenti, sulle sinapsi tra una cellula T e un suo neurone *follower*, hanno messo in evidenza che la modulazione dell'ampiezza della AHP determina una modulazione della forza sinaptica tra la cellula T e il suo *follower*. Infatti, alla riduzione dell'ampiezza della AHP che si ha nell'elemento presinaptico, con iniezione di cAMP, corrisponde un aumento dell'ampiezza del potenziale sinaptico nel neurone *follower* (**Fig. 8**) (Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*).

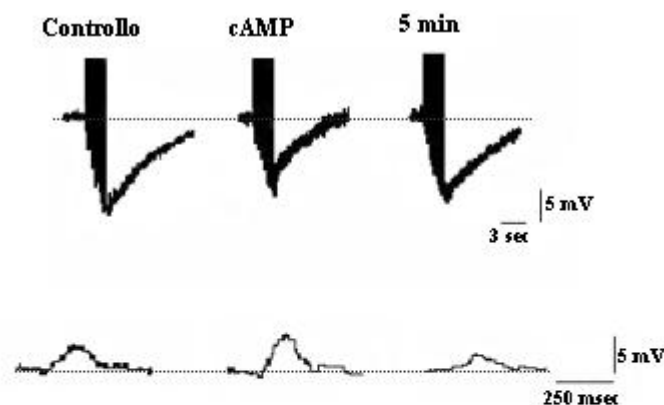


Fig. 8: Effetto della riduzione dell'ampiezza della AHP sull'ampiezza del potenziale postsinaptico registrato da un'altra cellula T considerata come *follower*. Alla riduzione dell'ampiezza della AHP indotta dall'iniezione di cAMP nel neurone presinaptico, corrisponde un incremento dell'ampiezza del potenziale sinaptico (modificata da: Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *European J Neurosci*, *submitted*).

Al contrario, all'aumento dell'ampiezza della AHP nell'elemento presinaptico, che si ha con la stimolazione ripetuta, corrisponde una riduzione dell'ampiezza del potenziale sinaptico (**Fig. 9**) (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002).

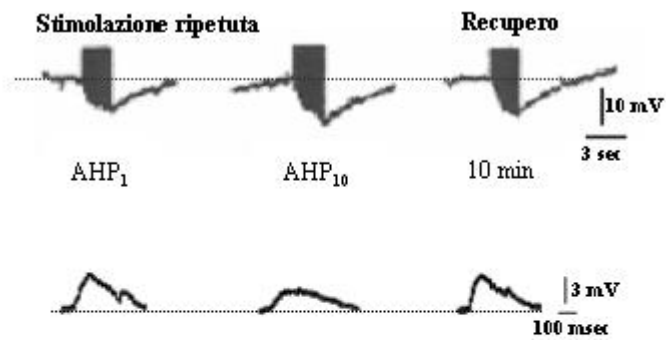


Fig. 9: Effetto dell'incremento dell'ampiezza della AHP sull'ampiezza del potenziale postsinaptico in un'altra cellula T presa come *follower*. Al progressivo aumento dell'ampiezza della AHP, corrisponde una riduzione dell'ampiezza del potenziale postsinaptico (modificata da: Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, *J.Neurophysiol.*, 88: 2490-500, 2002).

Considerata la stretta correlazione che esiste tra la modulazione dell'ampiezza della AHP e la modulazione dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi, i neuroni T di *H. medicinalis* possono rappresentare un buon modello sperimentale per indagare sulla modulazione dell'attività della pompa di membrana da parte di fattori intracellulari, in forme di plasticità neuronale.

PKA e PKC e plasticità sinaptica

Le PKA sono una famiglia di proteine che raggruppa le protein-chinasi attivate dal cAMP. Ciascuna PKA è costituita da due subunità regolatrici (R) e due subunità catalitiche (C). Quando le quattro subunità sono assemblate (R_2C_2), la PKA è inattiva. Il cAMP si lega alle subunità R dell'enzima e il legame induce una trasformazione conformazionale che provoca il rilascio delle subunità C. Queste ultime sono attivate dal distacco e catalizzano la fosforilazione dei residui di serina e treonina delle proteine bersaglio (Wolfe, 1995). Le subunità R presentano tre caratteristiche molecolari funzionalmente importanti: una zona dell'N-terminale, responsabile del legame con l'altra subunità R; una seconda regione dell'N-terminale con azione inibitoria sulla subunità C e due siti leganti, simili, per il cAMP (Kandel, Schwartz and Jessel, 1994). Queste tre caratteristiche sono presenti in tutte le isoforme conosciute di subunità R. La subunità C contiene un sito di legame per l'ATP e un sito capace di riconoscere alcune sequenze specifiche di amminoacidi presenti sui substrati proteici. Le subunità C si associano con le subunità R a livello di una regione dell'N-terminale. Alcune isoforme delle subunità R possono venire fosforilate, in questa zona della catena, da parte delle subunità C. Con questo meccanismo la regione regolatrice della molecola può fungere da substrato per la propria regione catalitica (Kandel, Schwartz and Jessel, 1994).

Un'altra famiglia di proteine importanti nella trasduzione del segnale intracellulare sono le PKC. A queste appartengono le protein-chinasi attivate dal Ca^{2+} , quelle attivate dalla via dell'inositolo-trifosfato ($InsP_3$)/diacilglicerolo (DAG) e quelle attivate sia dal Ca^{2+} che dall' $InsP_3$ /DAG. Le PKC hanno sede nel citoplasma quando si trovano nel loro stato inattivo. Il DAG fa sì che l'enzima venga incorporato nelle membrane dove forma un complesso attivo. Otto isoforme delle PKC sono presenti a livello del sistema nervoso centrale: quattro forme "principali" (α , β_I , β_{II} e γ) che posseggono tutte un sito legante per il Ca^{2+} (da cui dipendono in maniera differenziale), e quattro forme "minori" (δ , ϵ , ζ , η), che non hanno un sito di legame per il Ca^{2+} e, quindi, sono Ca^{2+} -indipendenti. Le diverse isoforme vengono codificate da geni distinti. Le PKC possiedono regioni catalitiche e regioni regolatrici localizzate in segmenti diversi di un'unica catena polipeptidica. Anche le PKC possono andare incontro ad autofosforilazione. Le isoforme "principali" rispondono

al DAG o agli esteri del forbolo; fanno eccezione le PKC γ che vengono attivate da basse concentrazioni di AA. I gruppi fosforici trasferiti dalle PKC possono stimolare o inibire l'attività delle proteine bersaglio (Wolfe, 1995).

Il ruolo critico che le PKA e le PKC hanno nei meccanismi di plasticità sinaptica è stato dimostrato in molti modelli sia di Vertebrato che di Invertebrato.

Molti sono gli studi condotti su *Aplysia*. In questo mollusco marino, le PKA e le PKC mediano la facilitazione a breve termine 5HT-dipendente (Byrne and Kandel, 1996). La 5HT, a livello della sinapsi sensori-motoria nel riflesso di retrazione della branchia e del sifone, determina una facilitazione presinaptica agendo via cAMP. La 5HT andandosi a legare al suo recettore sulla membrana presinaptica della sinapsi sensori-motoria, induce fosforilazione proteica mediata dalle PKA con conseguente chiusura dei canali Ks, aumento dell'entrata di Ca²⁺ e potenziamento del rilascio del neurotrasmettitore (Brunelli, Castellucci and Kandel, 1976; Klein, Camardo and Kandel, 1982). È stato osservato anche un evento di *crosstalk* tra questi due fattori intracellulari: l'attivazione prolungata delle PKC, indotta dalla preincubazione con esteri del forbolo, determinerebbe un'attenuazione dell'azione della 5HT mediata dalle PKA (Sugita, Douglas and Byrne, 1997). In passato, uno studio aveva dimostrato la prevalenza dell'attivazione delle PKA nella facilitazione di sinapsi non-depresse (sinapsi con normali livelli di trasmissione sinaptica), e il maggior contributo delle PKC nella facilitazione di sinapsi depresse (in cui la trasmissione è diminuita, di solito in seguito a stimolazione ripetuta) (Ghirardi, Braha, Hochner, Montarolo, Kandel and Dale, 1992). Più di recente, è stato individuato nella cascata intracellulare dell'isoforma *ApII* Ca²⁺-indipendente delle PKC, l'evento intracellulare indotto dalla 5HT a livello di sinapsi depresse.

Le PKC, inoltre, nello stesso modello animale, mediano la “memoria a intermedio termine” (ITM, *Intermediate Term Memory*). Si tratta di uno stadio della memoria temporalmente e fisiologicamente distinto dalle forme della memoria a breve e a lungo termine. Ghirardi, Montarolo e Kandel (1995) hanno osservato che l'applicazione ripetuta di 5HT determina una “facilitazione a intermedio termine” (ITF, *Intermediate Term Facilitation*). Esistono due distinte forme di ITF: una attività-indipendente (prodotta da 5 impulsi di 5HT in assenza di attività del neurone) in cui si ha sintesi proteica e persistente attivazione delle PKA; una seconda forma è

attività-dipendente (indotta dalla combinazione di un singolo impulso di 5HT con l'attività del neurone) in cui non è richiesta la sintesi proteica e sono attivate in maniera persistente le PKC (Sutton and Carew, 2000). La persistente attivazione delle PKC, richiesta per indurre e mantenere questa forma di memorizzazione, si ha con la proteolisi calpaina-dipendente delle molecole di PKC attivate (Sutton, Bagnall, Sharma, Shobe and Carew, 2004).

Ancora studiando i neuroni sensoriali di *Aplysia*, Müller e Carew (1998) hanno messo in evidenza che *patterns* di esposizione diversa di 5HT inducono forme di attivazione distinte delle PKA. Cinque minuti di impulsi di 5HT attivano le PKA in maniera transiente, in modo da non determinare eventi di trascrizione e traduzione; 4-5 impulsi di 5HT rendono attive le PKA per circa tre ore e si ha trascrizione genica; infine, 90 minuti di applicazione di 5HT attivano in modo persistente le PKA (per circa 20 ore) ed è richiesta trascrizione e traduzione genica. Durante l'instaurarsi della facilitazione a lungo termine, delle due isoforme di PKA presenti in *Aplysia* (PKA ApI e PKA ApII), è la PKA ApII ad essere essenziale. Infatti, è stato dimostrato un aumento nel neurone dell'espressione della subunità RII a livello del terminale sinaptico e una diminuzione della sintesi proteica della subunità RI durante lo stabilirsi della facilitazione (Liu, Hu, Schacher and Schwartz, 2004).

A livello dell'elemento presinaptico della sinapsi sensori-motoria in *Aplysia*, le PKA pare siano responsabili anche della coregolazione di due processi che avvengono durante la LTF: infatti, oltre che del rilascio di glutammato, le PKA sarebbero responsabili anche del suo *uptake* (Khabour, Levenson, Lyons, Kategaya, Chin, Byrne and Eskin, 2004). Infine, le PKA contribuiscono anche a mantenere le modificazioni a lungo termine prodotte dall'assotomia dei neuroni nocicettivi di *Aplysia* (Liao, Gunstream, Lewin, Ambron and Walters, 1999).

Anche in altri Invertebrati emerge il ruolo importante delle PKA e delle PKC in forme di plasticità sinaptica. In *Apis mellifera*, per esempio, nel condizionamento classico olfattivo del riflesso di estensione della proboscide, le PKA contribuiscono a indurre memoria a lungo termine (Fiala, Müller and Menzel, 1999). Müller (2000) ha osservato che nell'animale intatto, durante il condizionamento, c'è attivazione delle PKA con un ben distinto *pattern* temporale. D'altra parte, nella memorizzazione

precoce indotta da stimoli condizionanti multipli, pare sia coinvolta l'attivazione costitutiva delle PKC (Grünbaum and Müller, 1998).

Nella sinapsi tra le cellule dei peli vestibolari e i fotorecettori di tipo B in *Hermisenda crassicornis*, si ha aumento dell'eccitabilità dell'elemento postsinaptico dovuto all'incremento dell'attività delle PKC indotto dall'entrata di Ca^{2+} e da AA che è il prodotto della cascata molecolare innescata dal legame del GABA (rilasciato dal neurone presinaptico) con il suo recettore di membrana (Muzzio, Gandhi, Manyam, Pesnell and Matzel, 2001). Ancora sullo stesso modello sperimentale, alcuni Autori hanno analizzato il coinvolgimento delle PKA in cambiamenti dell'efficacia sinaptica indotti dalla facilitazione di una corrente Ca^{2+} voltaggio-dipendente (*P-Type current*) (Tamse, Xu, Song, Nie and Yamoah, 2003).

Le PKC, così come le PKA, sarebbero coinvolte anche in forme di apprendimento associativo. In maschi geneticamente modificati di *Drosophila*, in cui è selettivamente inibita l'attività delle PKC, quando sottoposti a test di corteggiamento, si ha inibizione di apprendimento associativo immediato benché non ci sia alterazione di formazione e conseguente dimostrazione di memoria. Il blocco genetico di queste protein chinasi, quindi, dissocia l'espressione dall'acquisizione e dalla conservazione di apprendimento condizionato (Kane, Robichon, Dickinson and Greenspan, 1997).

In *Lymnea*, è stato dimostrato che, nel riconsolidamento dopo il recupero di memoria consolidata, è richiesta l'attivazione delle PKA (Kemenes, Kemenes, Michel, Papp and Müller, 2006). Questi autori, infatti, hanno evidenziato che, nell'apprendimento associativo di questo modello sperimentale, è richiesta l'attività delle PKA nel riconsolidamento a 6 ore dopo il termine dell'addestramento.

Nel granchio *Chasmagnatus*, durante l'apprendimento associativo di tipo contestuale, è stato osservato un incremento dell'attività delle PKA immediatamente dopo e dopo 6 ore dal termine dell'addestramento (Locatelli and Romano, 2005).

Infine, nel topo, è stato dimostrato che l'isoforma PKC β ha un ruolo critico nei meccanismi di trasduzione del segnale correlati all'apprendimento. Topi *knock-out* per questa isoforma esibiscono, infatti, *deficits* nel condizionamento alla paura (Weeber, Atkins, Selcher, Varga, Mirnikjoo, Paylor, Leutges and Sweatt, 2000).

In altri modelli cellulari, sia le PKA che le PKC si sono dimostrate in grado di modulare l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi. Nel dotto collettore renale del ratto, le PKA inibiscono l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi attivando la via della fosfolipasi A_2 e, in particolare, aumentando la sintesi degli eicosainoidi che presumibilmente diminuiscono l'attività della pompa (Satoh, Cohen and Katz, 1993). Lo stesso meccanismo di modulazione è stato osservato anche nella regolazione dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi da parte delle PKC nei tubuli prossimali del rene (Ominato, Satho and Katz, 1996). Nei miociti ventricolari della cavia, l'attivazione della cascata cAMP/PKA determina un aumento dell'attività di trasporto della pompa (Kockskämper, Erlenkamp and Glitsch, 2000). Le PKC fosforilano la subunità $\alpha 1$ della Na^+/K^+ -ATPasi sulla Ser-16 in *Bufo marinus*. Questo porta ad un aumento dell'attività di trasporto della pompa dovuto ad un aumento dell'affinità della subunità per il Na^+ (Férraille, Beguin, Carranza, Gonin, Rousselot, Martin, Favre and Geering, 2000).

SCOPO della TESI

Nelle cellule sensoriali T della sanguisuga *Hirudo medicinalis*, l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi fornisce il maggior contributo alla genesi della AHP che accompagna la scarica dei potenziali d'azione in questi neuroni.

Nei nostri laboratori è stato dimostrato che modificazioni dell'ampiezza della AHP possono essere alla base di forme di plasticità sinaptica (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002; Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*) e che tali modificazioni sono il risultato di meccanismi intracellulari che portano alla modulazione dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi.

In particolare, il neurotrasmettitore 5HT si è dimostrato in grado di inibire l'attività dell'enzima di membrana attraverso l'aumento dei livelli intracellulari di cAMP; l'effetto di questa monoammina si evidenzia, a livello elettrofisiologico, con un notevole decremento dell'ampiezza della AHP. Un incremento progressivo dell'ampiezza della AHP, invece, si osserva in seguito a stimolazione ripetuta che porta ad un aumento dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi indotto dal Ca^{2+} , sia extra che intracellulare, che attiva la via 5-lipoossigenasica dell'AA.

Nell'Invertebrato, *Aplysia californica*, è stato messo in evidenza che, a livello della sinapsi sensori-motoria nel riflesso di retrazione della branchia e del sifone, la 5HT esplica un'azione facilitante, via cAMP, attivando le PKA. In altri modelli sperimentali è stato visto che il Ca^{2+} e i metaboliti dell'AA sono responsabili dell'attivazione delle PKC.

Queste osservazioni hanno suggerito di indagare un possibile coinvolgimento di PKA e PKC nel modello sperimentale di *H. medicinalis*. Infatti, nei meccanoettori T di *H. medicinalis*, le PKA potrebbero essere coinvolte nei meccanismi molecolari che portano alla riduzione dell'ampiezza della AHP attraverso l'inibizione della pompa di membrana Na^+/K^+ -ATPasi mediata dalla 5HT via cAMP. Le PKC, invece, potrebbero contribuire alla modulazione positiva dell'enzima, legata all'accumulo di Ca^{2+} intracellulare che si ha in seguito alla stimolazione ripetuta del neurone.

Allo scopo di verificare tali ipotesi, sono stati condotti esperimenti in presenza di inibitori sia delle PKA che delle PKC andando a valutare, con misure elettrofisiologiche, le variazioni di attività della Na^+/K^+ -ATPasi quando:

- a) la Na^+/K^+ -ATPasi veniva stimolata tonicamente con iniezioni intracellulari di Na^+ ;
- b) la pompa di membrana era stimolata fasicamente dall'iniezione intracellulare di impulsi depolarizzanti capaci di indurre una AHP.

MATERIALI e METODI

Animali

Sono state utilizzate sanguisughe adulte (di circa dieci mesi), della specie *Hirudo medicinalis*, fornite dalla ditta francese Ricarimpex (Eisynes, Francia).

Gli animali sono stati stabulati in un termostato alla temperatura di 16°C all'interno di recipienti areati contenenti acqua oligominerale Panna (secondo le indicazioni inviateci dalla ditta fornitrice) e sottoposti al naturale ciclo luce-buio.

Gli esperimenti sono stati condotti in vitro su gangli segmentali isolati. Veniva operata la dissezione di animali precedentemente anestetizzati in una soluzione di etanolo ed acqua di fonte al 10%, per circa 15 minuti, e quindi fissati ad una vaschetta di *plexiglass*, con il fondo rivestito di paraffina, con il ventre rivolto verso l'alto. Si procedeva quindi all'estrazione della catena gangliare operando, sotto microscopio binoculare, un'incisione degli strati muscolari e del seno venoso lungo la linea mediana del corpo e si isolava ogni ganglio dopo averlo liberato dalla guaina di tessuto connettivo. L'operazione veniva eseguita a temperatura ambiente, mantenendo la sanguisuga immersa in un'opportuna soluzione fisiologica (vedi oltre).

Sono stati prelevati i gangli segmentali dal 7° al 15°, evitando il quinto e il sesto; questi ultimi presentano una citoarchitettura meno stereotipata, in quanto contengono anche neuroni che innervano gli organi riproduttivi (Macagno, 1980) e quindi è più difficile riconoscere le cellule da utilizzare per le registrazioni.

Dopo almeno un'ora dal termine dell'operazione, tempo necessario affinché il preparato superi il trauma postoperatorio, i gangli venivano fissati singolarmente sul fondo di una camera di registrazione rivestita di resina trasparente *Sylgard* (Dow Corning, Midland, MI, USA). Per la registrazione elettrofisiologica, la cameretta veniva posta sotto un microscopio in campo scuro.

Durante la registrazione, il preparato era perfuso costantemente e in modo omogeneo, per mezzo di una pompa peristaltica (1 cc/minuto) (Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, Illinois), con la stessa soluzione fisiologica con cui veniva condotta la dissezione.

Soluzioni

La soluzione fisiologica utilizzata sia per la dissezione sia per le registrazioni elettrofisiologiche era così composta: NaCl 115 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, glucosio 10 mM, tamponata a pH 7,4 con TRIS-maleato.

I seguenti composti:

- Chelerritrina (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- 5-idrossitriptamina (5HT) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- 8-Br-cAMP (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- KT 5720 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- Inibitore delle PKA: peptide 14-22-amide, permeabile alla membrana, miristoilato (*Protein Kinase A Inhibitor*, PKAI) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- Rp-8-Br-cAMPS (Biolog Life Science Institute, Bremen, Germania)

sono stati applicati, extracellularmente, disciolti nella soluzione fisiologica.

La chelerritrina e il KT 5720, per problemi di solubilità, sono stati disciolti in DMSO (dimetilsolfossido, solvente lipofilo) 1:1000 prima di essere aggiunte alla soluzione di perfusione. A tale diluizione il DMSO non danneggia la membrana plasmatica e non modifica alcun parametro elettrofisiologico.

I protocolli sperimentali utilizzati per le diverse sostanze saranno descritti singolarmente nel capitolo “Risultati”.

Registrazioni elettrofisiologiche

La tecnica di registrazione utilizzata è il *current clamp* convenzionale.

Osservando al microscopio in campo scuro un ganglio segmentale, posto con il lato ventrale rivolto verso l'alto, è possibile riconoscere i neuroni T per forma e posizione (Baylor and Nicholls, 1969a). Le cellule T venivano penetrate con micropipette di borosilicato (diametro esterno 1,5 mm; diametro interno 0,8 mm) ricavate da capillari disponibili in commercio (Hilgerberg GmbH, Germany) e opportunamente forgiate con un *puller* a controllo computerizzato (Brown Flaming P-97, Sutter Instruments, USA). Le micropipette, riempite con una soluzione di potassio acetato (CH₃COOK)

4 M tamponato a pH 7,4, costituivano il supporto meccanico del microelettrodo rappresentato da un filo di argento clorurato. Sono state utilizzate micropipette che, una volta riempite, mostravano una resistenza variabile tra 80 e 120 MΩ. Una *pellet* di argento clorurato era l'elettrodo di riferimento che chiudeva il circuito nel bagno di perfusione.

I segnali in voltaggio sono stati rilevati attraverso un amplificatore Axoclamp 2B (Axon Instruments, Union City, CA, USA) e filtrati ad una frequenza di 30 kHz. Poi venivano digitalizzati e campionati alla frequenza di 10 kHz tramite un'interfaccia BNC-2090 (National Instruments S.r.l., Milano, Italia) collegata ad un sistema di acquisizione e stimolazione (LabView, National Instruments, Austin, Texas, USA). In questo modo, era possibile stimolare e registrare contemporaneamente con un solo elettrodo ed acquisire in tempo reale le risposte che erano immagazzinate su un computer per essere analizzate successivamente.

Durante le registrazioni sono stati valutati i seguenti parametri elettrofisiologici: il potenziale di membrana a riposo (V_m), la resistenza di ingresso (R_m) e l'ampiezza della AHP.

In particolare, sono stati utilizzati due protocolli sperimentali per ottenere due diverse modalità di attivazione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi definite rispettivamente “tonica” e “fasica”.

- L'attivazione tonica dell'enzima di membrana è stata ottenuta iniettando Na^+ nel soma della cellula. A tale scopo sono stati utilizzati elettrodi riempiti con sodio acetato (CH_3COONa) 2 M con i quali venivano penetrati i somi dei neuroni. Il *leakage* di ioni Na^+ all'interno della cellula, rappresenta uno stimolo tonico per l'azione elettrogenica della Na^+/K^+ -ATPasi. Ciò determina una rapida iperpolarizzazione del V_m che, dopo 5 minuti dall'inizio dell'iniezione, si stabilizza ad un valore iperpolarizzato che permane per tutto il tempo dell'iniezione di Na^+ (**Fig. 10**) (Baylor and Nicholls, 1969a; Catarsi, Scuri and Brunelli, 1993; Mozzachiodi, Scuri, Roberto and Brunelli, 2001).

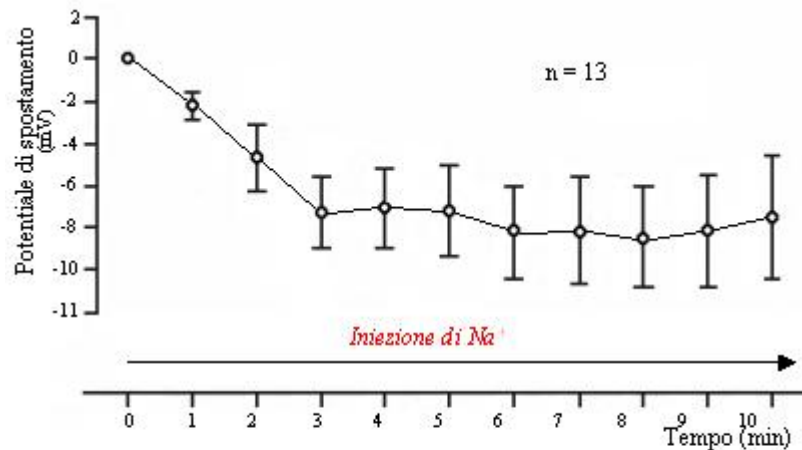


Fig. 10: Effetti dell'iniezione intracellulare di Na^+ sul potenziale di membrana. In ordinata è riportato il potenziale di spostamento registrato ogni minuto durante l'iniezione di Na^+ in cellule T; in ascissa, è riportato il tempo di iniezione di Na^+ (modificata da: Lombardo, Scuri, Cataldo, Calvani, Nicolai, Mosconi and Brunelli, *Neurosci*, 128: 293-303, 2004).

- L'attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi, viene indotta dall'incremento intracellulare di ioni Na^+ legato alla scarica di potenziali d'azione. Sono stati condotti esperimenti di stimolazione elettrica in grado di indurre una singola AHP e di stimolazione ripetuta che induce un incremento progressivo dell'ampiezza della AHP.

La AHP è stata indotta iniettando treni di impulsi depolarizzanti (durata 200 msec; frequenza 2,5 Hz) per un tempo complessivo di 3 sec. Poiché l'ampiezza della AHP dipende dal numero di potenziali d'azione, la frequenza di scarica è stata mantenuta costante durante ogni singola registrazione regolando la quantità di corrente iniettata (compresa tra 0,4 e 0,8 nA). L'intensità di corrente scelta era quella in grado di far sorgere, nella cellula T, 7-8 potenziali d'azione per ogni impulso di 200 msec, che corrispondono al numero di *spikes* indotti dalla stimolazione tattile della cute dell'animale (Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*).

Durante le varie fasi sperimentali, V_m e R_m erano costantemente monitorati e sono stati studiati solo quei neuroni che mostravano una $R_m > 50 \text{ M}\Omega$ e un V_m a riposo di almeno -40 mV.

Raccolta dati e analisi statistica

Negli esperimenti di iniezione di Na^+ , l'entità dell'attivazione della Na^+/K^+ -ATPasi è stata misurata valutando il potenziale di spostamento, ovvero la differenza tra il V_m registrato ai vari tempi durante l'iniezione di Na^+ e il V_m misurato immediatamente dopo avere penetrato la cellula con l'elettrodo al Na^+ . I dati sono stati espressi come media \pm errore standard (E.S.) e l'effetto dei singoli inibitori è stato confrontato con le cellule di controllo utilizzando il test statistico ANOVA a due vie per misure ripetute, in cui è stata considerata come variabile dipendente la differenza di V_m registrata ogni minuto e come variabile indipendente il trattamento.

Negli esperimenti di attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi, i valori di V_m , di R_m e dell'ampiezza della AHP venivano misurati in ogni singola fase dell'esperimento. In particolare, R_m veniva misurata iniettando impulsi iperpolarizzanti di 200 msec di durata e di 0,5 nA di intensità e valutando lo scalino di V_m ottenuto. Per le singole AHPs, le ampiezze venivano misurate a partire dalla linea di base, che rappresenta il V_m a riposo, fino al picco della deflessione.

I dati anche in questo caso sono stati espressi come media \pm E.S..

Poiché il test di Kolmogorov-Smirnov ha dimostrato che non era soddisfatta la distribuzione normale nei campioni da noi utilizzati, le variazioni dell'ampiezza della AHP, di R_m e di V_m sono stati valutati con opportuni test per dati non parametrici. In particolare, per un'analisi multipla sono stati utilizzati ANOVA di Friedmann e il Dunnet Post Hoc Test per evidenziare le differenze significative tra i risultati ottenuti in controllo e quelli ottenuti nelle varie fasi sperimentali. Per il confronto tra due campioni di dati non appaiati, è stato applicato il Wilcoxon test.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software StatSoft (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e la significatività statistica è stata posta a $p < 0,05$.

RISULTATI

Effetti dell'iniezione di Na^+ dopo trattamento con diversi inibitori delle PKA

Per evidenziare un eventuale effetto modulatorio da parte delle PKA sull'attivazione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi, sono stati inizialmente condotti esperimenti di iniezioni di Na^+ in presenza di differenti inibitori delle PKA a diversa modalità d'azione.

Sono stati utilizzati: (PKAI) 14-22-amide, che agisce come substrato delle subunità catalitiche delle PKA (Glass, Cheng, Mende-Muller, Reed and Walsh, 1989; Rimon and Rubin, 1998); KT 5720, che blocca il sito di legame per l'ATP che agisce fermando direttamente il processo di fosforilazione delle PKA (Davies, Reddy, Caivano and Cohen, 2000); Rp-8-Br-cAMPS, che è un analogo del cAMP, previene la dissociazione delle PKA e la liberazione delle subunità catalitiche attive (Dostmann, Taylor, Genieser, Jastorff, Doskeland and OGREID, 1990).

Secondo le indicazioni riportate in letteratura (Glass, Cheng, Mende-Muller, Reed and Walsh, 1989; Dostmann, Taylor, Genieser, Jastorff, Doskeland and OGREID, 1990; Rimon and Rubin, 1998; Davies, Reddy, Caivano and Cohen, 2000), i gangli trattati con PKAI 0,1 μM e quelli trattati con KT 5720 1 μM sono stati preincubati per 10 minuti, mentre i gangli trattati con Rp-8-Br-cAMPS 5 μM sono stati preincubati per 30 minuti.

Al termine del periodo di preincubazione, le cellule T venivano penetrate con elettrodi riempiti con sodio acetato 2M e veniva monitorato il V_m ogni minuto per 5 minuti, mentre i gangli erano perfusi in soluzione fisiologica.

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti in un gruppo di controllo rappresentato da cellule T preincubate in soluzione fisiologica e sono stati graficati in **Fig. 11** dove è riportato in ordinata il potenziale di spostamento (ovvero la differenza tra il V_m registrato ai vari tempi durante l'iniezione di Na^+ e il V_m misurato immediatamente dopo avere penetrato la cellula con l'elettrodo al Na^+) e in ascissa il tempo di iniezione di Na^+ .

L'iniezione intracellulare di Na^+ determinava nelle cellule di controllo (■) una rapida iperpolarizzazione del V_m che, dopo 5 minuti dall'inizio dell'iniezione, si stabilizzava ad un valore iperpolarizzato come riportato in letteratura (Baylor and

Nicholls, 1969a; Catarsi, Scuri and Brunelli, 1993; Mozzachiodi, Scuri, Roberto and Brunelli, 2001).

Le cellule trattate con PKAI 0,1 μM (●), KT5720 1 μM (▲), Rp-8-Br-cAMPS 5 μM (▼) mostravano un'iperpolarizzazione maggiore rispetto al gruppo di controllo (■), come è stato evidenziato anche dal test ANOVA a due vie per misure ripetute riportato in Tabella 1 (Fig. 11).

L'Rp-8-Br-cAMPS è risultato essere l'inibitore più efficace, in quanto ha determinato un potenziale di spostamento massimo (differenza tra il V_m di riposo e quello misurato a 5 minuti dall'inizio dell'iniezione) maggiore rispetto agli altri inibitori utilizzati (Tabella 1). Per questo motivo è stato l'inibitore utilizzato negli esperimenti successivi.

I dati riportati mostrano che, in presenza degli inibitori delle PKA utilizzati, l'iniezione di Na^+ determina una maggiore iperpolarizzazione rispetto al controllo; questo indica che, in presenza di tali sostanze, la Na^+/K^+ -ATPasi è maggiormente attivata. Quindi, quando inibite, le PKA tengono meno a freno l'attività della pompa di membrana. Questo suggerisce che le PKA esercitino un'azione inibitoria continua sull'attività della Na^+/K^+ -ATPasi indotta dal *leakage* di Na^+ .

Tabella 1

	Potenziale di membrana iniziale (mV)	Potenziale di spostamento massimo (mV)	ANOVA per misure ripetute effetto del trattamento	
Controllo	$-44 \pm 3,7$	$-7,4 \pm 3,2$		
PKAI 0,1 μ M	$-42,8 \pm 1,7$	$-13,6 \pm 2,6$	$F_{(1,13)} = 3,80$	$p = 0,008$
KT 5720 1 μ M	$-44 \pm 4,5$	$-18,7 \pm 2,7$	$F_{(1,17)} = 4,05$	$p = 0,006$
Rp-8-Br- cAMPS 5 μ M	$-53,3 \pm 3,2$	$-21,9 \pm 3,5$	$F_{(1,21)} = 3,80$	$p = 0,007$

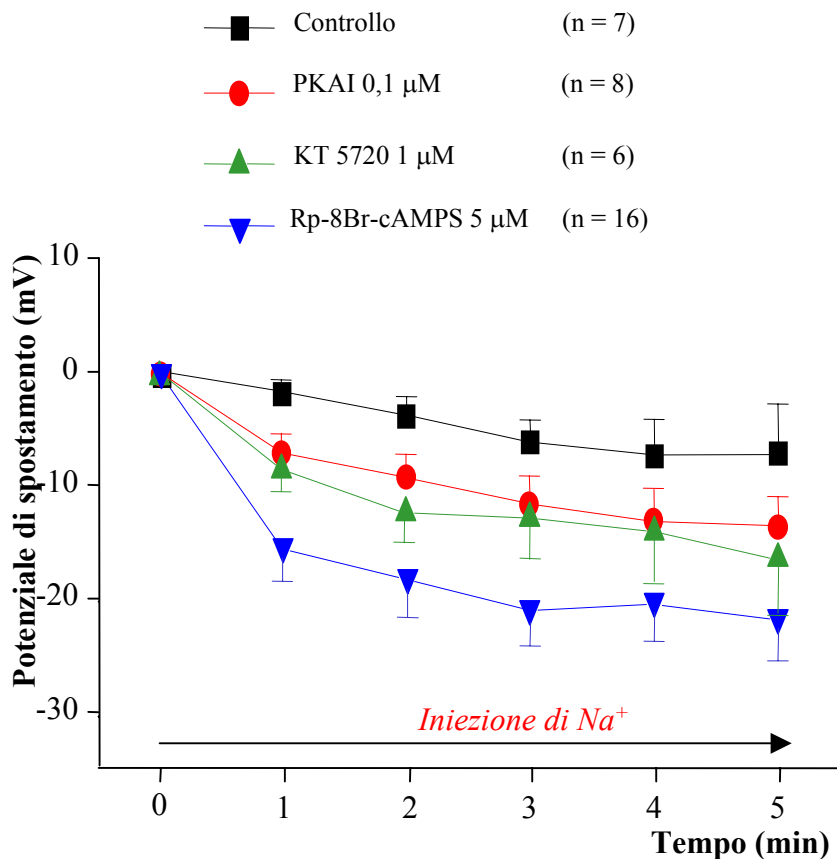


Fig. 11: Iniezione di Na^+ in presenza di vari inibitori delle PKA.

In ordinata è riportato il potenziale di spostamento registrato ogni minuto durante l'iniezione di Na^+ nelle cellule T: (■) trattate con soluzione fisiologica (controllo); preincubate con (●) PKAI 0,1 μM o con (▲) KT 5720 1 μM per 10 minuti e poi perfuse con soluzione fisiologica; preincubate per 30 minuti con Rp-8-Br-cAMPS (▼) 5 μM e poi perfuse con soluzione fisiologica. In ascissa è riportato il tempo di iniezione di Na^+ . Le cellule trattate con gli inibitori delle PKA mostrano una più marcata iperpolarizzazione rispetto alle cellule di controllo.

Effetti dell'iniezione di Na^+ dopo trattamento con Rp-8-Br-cAMPS e 5HT e 8-Br-cAMP

Nell'esperimento precedente, è stato messo in evidenza il ruolo modulatorio negativo delle PKA sull'attivazione tonica della Na^+/K^+ -ATPasi.

In precedenza, era stato osservato che, nelle cellule T di *H. medicinalis*, la 5HT modula in senso negativo l'attività della pompa di membrana, via cAMP (vedi pag. 17). Per chiarire se l'azione inibitoria da parte della 5HT sulla pompa elettrogenica si esplicasse attraverso l'attivazione delle PKA, un gruppo di gangli, dopo essere stati preincubati con Rp-8-Br-cAMPS 5 μM , per 30 minuti, è stato perfuso per 10 minuti con 5HT 50 μM (○); un secondo gruppo, dopo preincubazione con Rp-8-Br-cAMPS 5 μM , è stato perfuso per 10 min con 8-Br-cAMP 100 μM (▲) (un analogo permeabile del cAMP; Catarsi, Scuri and Brunelli, 1993) e un terzo gruppo (■), dopo preincubazione con l'inibitore, è stato perfuso con soluzione fisiologica (il controllo). Al termine del periodo di trattamento, le cellule T sono state penetrate con elettrodi riempiti di sodio acetato 2M e il V_m è stato campionato ogni minuto per 5 minuti.

Nel grafico di **Fig. 12**, sono mostrati i risultati ottenuti, andando a considerare il potenziale di spostamento durante il tempo di iniezione di Na^+ . Sia in presenza di 5HT che in presenza di 8-Br-cAMP il V_m si depolarizzava, mentre, le cellule trattate soltanto con l'inibitore mostravano un'ampia iperpolarizzazione. Infatti, come evidenziato dal test statistico ANOVA per misure ripetute, le curve dei gruppi trattati con 5HT e 8-Br-cAMP sono significativamente diverse rispetto al controllo (Tabella 2).

La depolarizzazione di membrana indotta da 5HT e da 8-Br-cAMP conferma l'effetto inibitorio da parte di queste sostanze sull'attività della Na^+/K^+ -ATPasi. Considerato l'effetto opposto dell'Rp-8-Br-cAMPS sul potenziale di membrana, si può concludere che 5HT e cAMP modulano negativamente l'attivazione tonica della pompa senza richiedere il coinvolgimento delle PKA.

Tabella 2

	Potenziale di membrana iniziale (mV)	Potenziale di spostamento massimo (mV)	ANOVA per misure ripetute effetto del trattamento	
Rp-8-Br- cAMPS 5 μ M	-53,7 \pm 3,5	-20,1 \pm 3,5		
Rp-8-Br- cAMPS + 5HT	-40,7 \pm 1,4	-4,02 \pm 1,3	$F_{(1,28)} = 27,98$	$p < 0,001$
Rp-8-Br- cAMPS + 8-Br- cAMP	-41,7 \pm 1,8	2,66 \pm 1,56	$F_{(1,31)} = 38,73$	$p < 0,001$

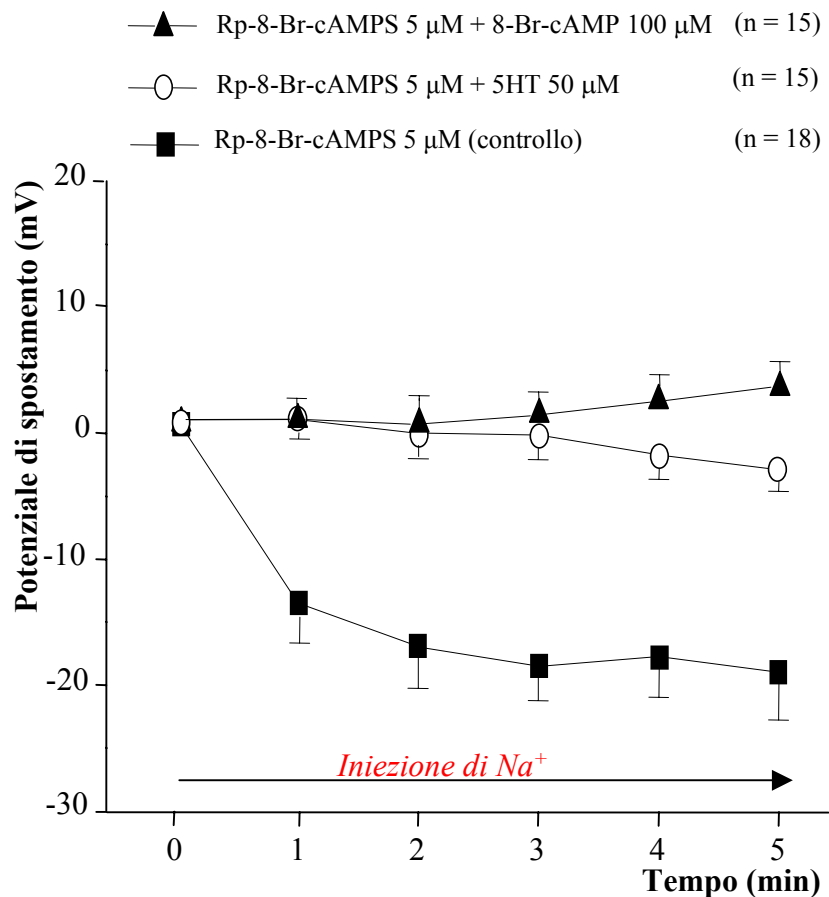


Fig. 12: L'inibizione delle PKA non influenza gli effetti prodotti da 5HT e 8-Br-cAMP sulla Na^+/K^+ -ATPasi.

Il grafico mostra l'andamento del V_m , misurato come potenziale di spostamento, durante l'iniezione intracellulare di Na^+ 2 M in cellule T di gangli preincubati: per 30 minuti con Rp-8-Br-cAMPS 5 μ M (■); per 30 minuti con Rp-8-Br-cAMPS 5 μ M e poi perfusi per 10 minuti con 5HT 50 μ M (○); per 30 minuti con Rp-8-Br-cAMPS 5 μ M e poi perfusi per 10 minuti con 8-Br-cAMP 100 μ M (▲). Sia la 5HT che l'analogo permeabile del cAMP continuano ad inibire l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi anche in presenza dell'inibitore delle PKA.

Effetti dell’Rp-8-Br-cAMPS sull’attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi

Per evidenziare un’eventuale modulazione da parte delle PKA sull’attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi, sono state condotte registrazioni intracellulari, in presenza di Rp-8-Br-cAMPS, durante le quali la cellula veniva stimolata con treni di impulsi depolarizzanti capaci di generare una AHP (vedi “Materiali e Metodi”).

In una stessa cellula sono stati analizzati i valori di V_m , R_m e ampiezza della AHP nelle diverse fasi sperimentali: in soluzione fisiologica (□), dopo 30 minuti di trattamento con Rp-8-Br-cAMPS 50nM (■), e durante il lavaggio con soluzione fisiologica a 15 (▒) e a 30 minuti (▓).

La concentrazione di inibitore utilizzata in queste registrazioni è minore rispetto a quella utilizzata negli esperimenti precedenti. Questa scelta sperimentale è stata dettata dal fatto che non era possibile condurre registrazioni con concentrazioni di inibitore più elevate, in quanto le cellule non sopravvivevano in buone condizioni per il tempo richiesto dal protocollo sperimentale.

Gli istogrammi di **Fig. 13** mostrano i valori medi di V_m , R_m e AHP registrati nelle diverse fasi sperimentali normalizzati ai valori registrati prima del trattamento con Rp-8-Br-cAMPS, che sono stati considerati il 100%.

Con il test statistico ANOVA di Friedman è stato possibile confrontare i risultati ottenuti nelle diverse fasi sperimentali con quelli ottenuti in soluzione fisiologica (Tabella 3). L’ampiezza della AHP misurata dopo il trattamento con l’inibitore è risultata ridotta e questa riduzione è statisticamente significativa a partire dai 15 minuti di lavaggio. La significatività è stata messa in evidenza con il Dunnet Post Hoc test. Non si hanno, invece, variazioni significative nei valori di V_m e R_m (Tabella 3).

La riduzione dell’ampiezza della AHP indotta dall’inibitore delle PKA suggerisce che l’inibizione di questi fattori intracellulari determina una riduzione dell’attività della Na^+/K^+ -ATPasi quando questa è stimolata fasicamente. Quindi, questi dati suggeriscono che le PKA esercitano una modulazione positiva sull’attivazione fasica della pompa elettrogenica.

Tabella 3

	AHP (mV)	ANOVA di Friedmann p = 0,012	Dunnet Post Hoc test Controllo vs Trattati
Controllo	11,32 ± 1,5		
Rp-8-Br-cAMPS	8,6 ± 1,6		p > 0,05
15 minuti di lavaggio	6,6 ± 1,7		p < 0,05
30 minuti di lavaggio	6,2 ± 1,4		p < 0,05

	Vm (mV)	ANOVA di Friedmann p = 0,09
Controllo	-57,5 ± 4,9	
Rp-8-Br-cAMPS	-55,07 ± 5,9	
15 minuti di lavaggio	-52,7 ± 5,4	
30 minuti di lavaggio	-52,4 ± 5,9	

	Rm (MΩ)	ANOVA di Friedmann p = 0,77
Controllo	96,9 ± 5,4	
Rp-8-Br-cAMPS	97,6 ± 6,8	
15 minuti di lavaggio	89,3 ± 9,02	
30 minuti di lavaggio	91,7 ± 9,5	

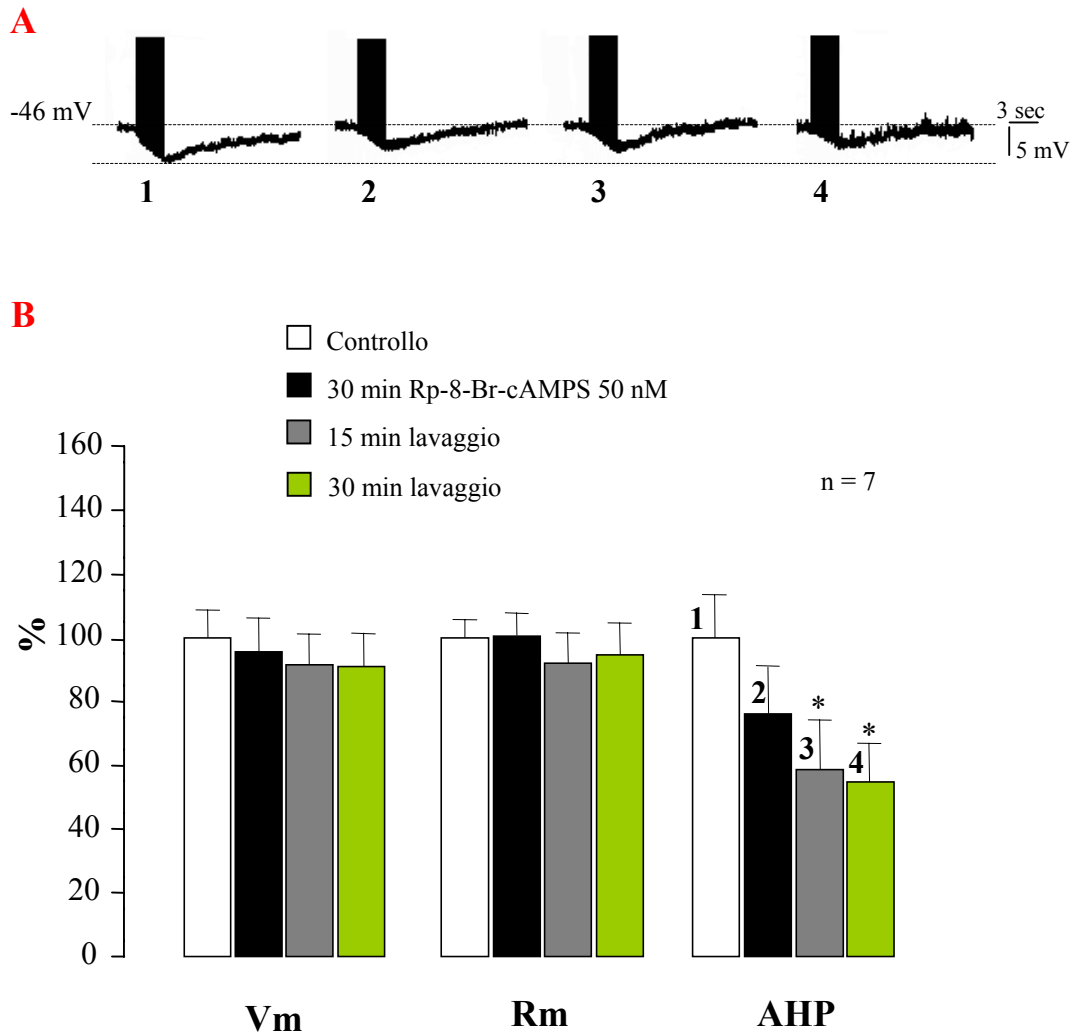


Fig. 13: Effetti dell'Rp-8-Br-cAMPS sull'attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi.

A: Tracce registrate da un singolo neurone T in controllo (1), dopo 30 minuti di perfusione con Rp-8-Br-cAMPS (2) e a 15 (3) e 30 (4) minuti di lavaggio in soluzione fisiologica. **B:** Gli istogrammi mostrano gli effetti di Rp-8-Br-cAMPS 50 nM applicato per 30 minuti sul voltaggio di membrana (Vm), la resistenza di ingresso (Rm), e l'ampiezza della AHP in un campione di 7 cellule T. I valori medi \pm E.S. di Vm, Rm e AHP registrati dopo l'applicazione della sostanza (colonne nere), a 15 minuti di lavaggio (colonne grigie) e a 30 minuti di lavaggio in soluzione fisiologica (colonne verdi) sono stati normalizzati ai valori medi \pm E.S. registrati prima del trattamento con Rp-8-Br-cAMPS, in soluzione fisiologica (controllo, colonne bianche) considerati come il 100%. Si noti che il trattamento con Rp-8-Br-cAMPS produce una riduzione dell'ampiezza della AHP mentre non determina variazioni di Vm e Rm. * indica $p < 0,05$.

Effetto dell'iniezione di Na^+ dopo trattamento con cheleritrina

Allo scopo di mettere in evidenza un possibile ruolo modulatorio delle PKC sull'attività della Na^+/K^+ -ATPasi, sono state condotte registrazioni intracellulari da cellule T in presenza di un inibitore delle PKC, la cheleritrina.

Anche in questo caso, è stata effettuata l'iniezione di Na^+ dopo il trattamento con l'inibitore e sono state valutate le variazioni del V_m .

16 gangli sono stati preincubati con cheleritrina $1 \mu\text{M}$ per 30 minuti. Immediatamente dopo il termine del trattamento, un neurone T per ganglio è stato penetrato con elettrodo al Na^+ , mentre il preparato era perfuso con soluzione fisiologica. Il V_m è stato rilevato ogni minuto, per tutta la durata dell'iniezione e il potenziale di spostamento è stato confrontato con le variazioni di V_m registrate nelle cellule T di 10 gangli perfusi con soluzione fisiologica.

I risultati ottenuti sono mostrati nel grafico di **Fig. 14**, dove in ordinata è riportato il potenziale di spostamento e in ascissa il tempo di iniezione di Na^+ . Con il test statistico ANOVA per misure ripetute sono stati confrontati (Tabella 4) i dati ottenuti nelle cellule dei gangli perfusi con soluzione fisiologica (■) con quelli ottenuti nelle cellule dei gangli trattati con cheleritrina (○).

Le curve relative ai due gruppi di cellule sono risultate significativamente differenti: infatti, in presenza dell'inibitore, non si osservava l'iperpolarizzazione del potenziale di membrana dovuta al *leakage* di Na^+ , bensì si aveva una depolarizzazione. Tale depolarizzazione indica un accumulo di cariche positive all'interno della cellula dovuto all'inibizione dell'attività della pompa di membrana.

I risultati ottenuti, quindi, indicano che l'inibizione delle PKC determina una riduzione dell'attività della pompa; ciò suggerisce che le PKC modulano positivamente l'attivazione tonica della Na^+/K^+ -ATPasi.

Tabella 4

	Potenziale di membrana (mV)	Potenziale di spostamento massimo (mV)	ANOVA per misure ripetute effetto del trattamento	
Controllo	-46,7 ± 2,5	-11,11 ± 2,3		
Cheleritrina	-50,3 ± 2,6	-5,12 ± 1,96	$F_{(1,24)} = 2,90$	p = 0,023

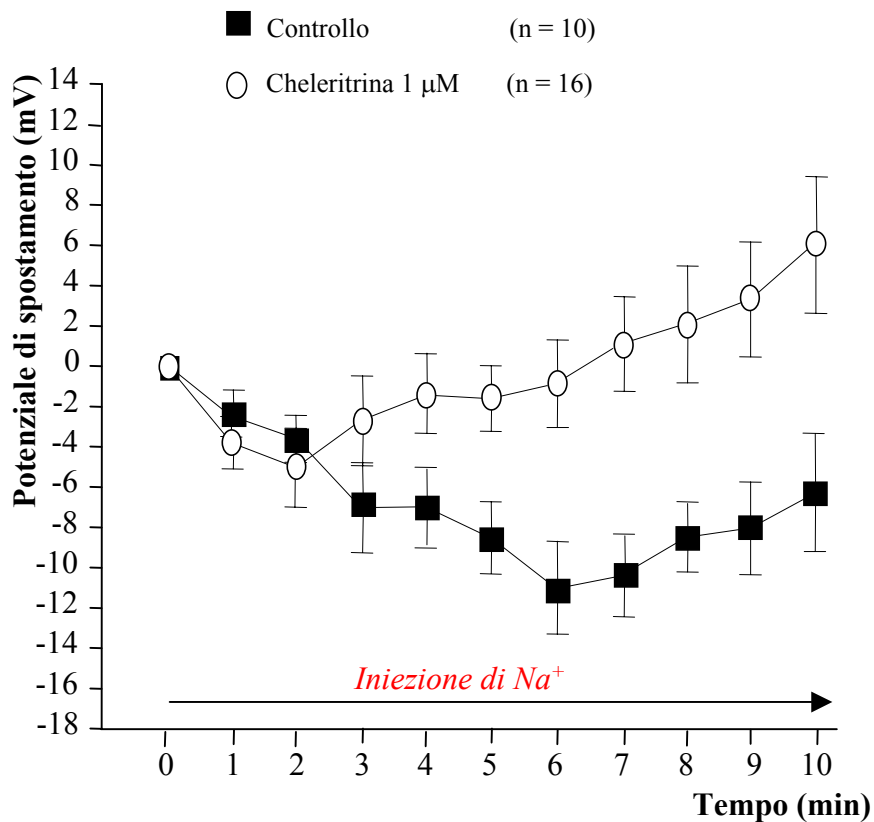


Fig. 14: Effetto della chelerytrina sull'azione tonica elettrogenica della Na^+/K^+ -ATPasi.

Il grafico mostra l'andamento del potenziale di spostamento durante l'iniezione intracellulare di Na^+ 2 M in cellule T di gangli preincubati per 30 minuti con chelerytrina $1\mu\text{M}$ (○) e in cellule perfuse con soluzione fisiologica (■). La presenza dell'inibitore delle PKC determina una depolarizzazione di membrana in risposta all'iniezione di Na^+ .

Effetti della cheleritrina sull'attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi in seguito a stimolazione ripetuta

La cheleritrina è un inibitore delle PKC Ca^{2+} -dipendenti. Nelle cellule T, il Ca^{2+} è il *trigger* che innesca la cascata di eventi molecolari che portano all'incremento dell'ampiezza della AHP durante la stimolazione ripetuta (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2005). Allo scopo di analizzare un eventuale coinvolgimento delle PKC nella modulazione della Na^+/K^+ -ATPasi, quindi dell'ampiezza della AHP, durante la stimolazione ripetuta, sono stati condotti esperimenti in cui le cellule T sono state stimulate con 10 treni di impulsi depolarizzanti ad intervalli di 15 secondi prima (controllo) e dopo il trattamento con cheleritrina 1 μM , applicata nel bagno di perfusione per 30 minuti.

Gli istogrammi di **Fig. 15** mostrano i valori, in mV, delle ampiezze delle AHP misurate dopo il primo (AHP_1), il quinto (AHP_5) e il decimo (AHP_{10}) treno della stimolazione ripetuta, nelle due fasi sperimentali (controllo e trattato). Sia in controllo che dopo perfusione con cheleritrina si è osservato un progressivo incremento dell'ampiezza della AHP.

I risultati ottenuti sono stati analizzati con il test statistico ANOVA per misure ripetute (Tabella 5) che ha evidenziato che l'incremento dell'ampiezza della AHP ottenuto in presenza dell'inibitore era maggiore, in modo statisticamente significativo, rispetto all'incremento ottenuto in controllo. In Tabella 5 sono riportati anche i valori medi di V_m e R_m misurati nelle due fasi sperimentali e analizzati con il Wilcoxon test. La cheleritrina non modifica significativamente questi parametri rispetto al controllo in soluzione fisiologica.

I risultati ottenuti indicano che l'inibizione delle PKC determina un incremento dell'attivazione fasica della pompa elettrogenica; le PKC, quindi, esercitano un'azione inibitoria su questo tipo di attivazione della Na^+/K^+ -ATPasi.

Tabella 5

Parametro	Controllo	Chelitrina 1 μ M	p		Test statistico
V _m (mV)	-45,2 \pm 2,89	-46 \pm 2,82	0,465		Wilcoxon test
R _m (M Ω)	73,1 \pm 3,1	89,12 \pm 13,03	0,465		Wilcoxon test
			F	p	ANOVA per misura ripetute
AHP ₁ (mV)	7,04 \pm 1,63	9 \pm 1,76	15,027	< 0,001	
AHP ₅ (mV)	9,29 \pm 1,64	17,42 \pm 3,41			
AHP ₁₀ (mV)	11,01 \pm 2,74	21,44 \pm 4,71			

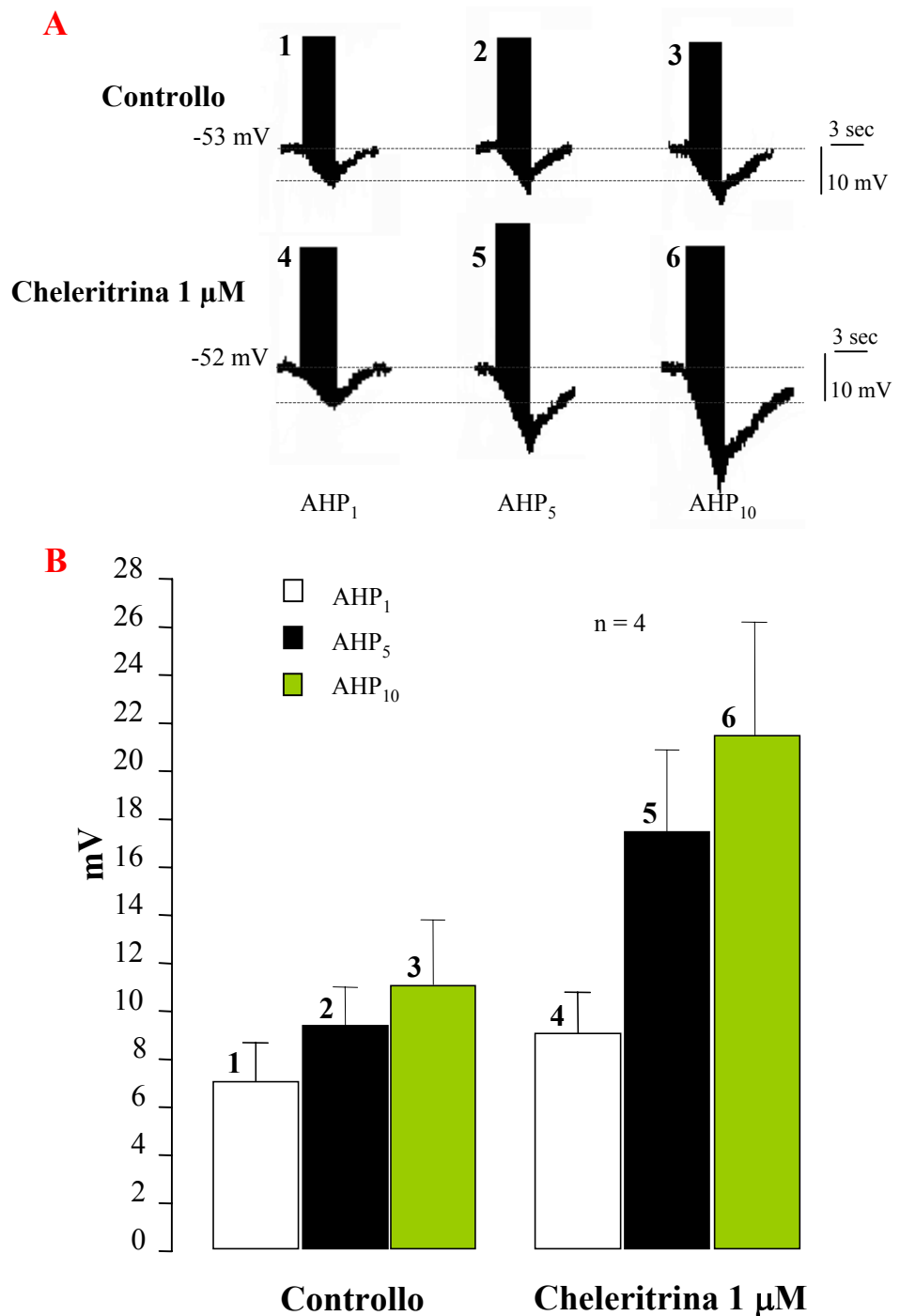


Fig. 15: Effetti della cheleritrina sull'incremento dell'ampiezza della AHP in seguito a stimolazione ripetuta.

A: Tracce registrate da un singolo neurone T sottoposto a stimolazione ripetuta con 10 treni di impulsi depolarizzanti prima (1, 2, 3) e dopo (4, 5, 6) applicazione di cheleritrina 1 μ M. **B:** Gli istogrammi mostrano le medie \pm E.S. dei valori di AHP₁ (colonna bianca), AHP₅ (colonna nera) e AHP₁₀ (colonna verde) misurati in soluzione fisiologica (controllo) e dopo 30 minuti di applicazione di cheleritrina. Come si può osservare, in presenza dell'inibitore delle PKC, la stimolazione ripetuta determina un progressivo incremento dell'ampiezza della AHP di entità maggiore di quello ottenuto nel controllo.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questa tesi mettono in evidenza come, nelle cellule sensoriali T della sanguisuga *H. medicinalis*, l'attività delle PKA e delle PKC sia in grado di modulare l'attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi in modo opposto e diverso a seconda del tipo di stimolazione applicata.

Durante l'iniezione intracellulare di Na^+ , che rappresenta uno stimolo tonico per l'enzima di membrana, le PKA sembrerebbero modulare negativamente l'attività dell'enzima, mentre le PKC avrebbero un'azione attivante (**Fig. 16A**). In presenza di diversi inibitori delle PKA, infatti, la *leakage* di Na^+ determina un'iperpolarizzazione del V_m che è significativamente maggiore rispetto a quella ottenuta in soluzione fisiologica; l'iniezione di Na^+ in presenza di cheleritina (inibitore delle PKC), invece, ha l'effetto opposto di depolarizzare il V_m .

L'attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi, nei neuroni T, si traduce nella genesi della AHP, la cui ampiezza è dovuta per l'80% all'azione della pompa (Baylor and Nicholls, 1969a). Misurazioni dell'ampiezza della AHP, quindi, forniscono un buon parametro per caratterizzare l'eventuale effetto modulatore che certi fattori intracellulari possono esercitare sull'attivazione fasica dell'enzima di membrana. Anche in questo tipo di stimolazione della pompa, è risultato che PKA e PKC hanno un effetto antagonista che, per ogni famiglia di chinasi, è opposto rispetto a quello esercitato durante l'iniezione intracellulare di Na^+ (**Fig. 16B**). L'inibitore Rp-8-Br-cAMPS delle PKA (inibitore che determina l'effetto maggiore tra quelli utilizzati) determina una riduzione significativa dell'ampiezza della AHP fino ad un decremento di oltre il 40% rispetto al valore di controllo. Questo dato indica che l'inibizione delle PKA, quando la pompa è stimolata fasicamente, provoca un aumento della sua attività maggiore a quello che si ottiene in soluzione fisiologica e, pertanto, suggerisce che le PKA possano modulare positivamente questa sua attivazione. D'altra parte, in presenza di cheleritina, il potenziamento dell'ampiezza della AHP, che si ottiene quando la cellula viene stimolata ripetutamente, è significativamente maggiore rispetto all'incremento ottenuto in soluzione fisiologica. Da questi risultati emerge che le PKC possono svolgere un'azione inibitoria sull'attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi poiché la loro inibizione determina

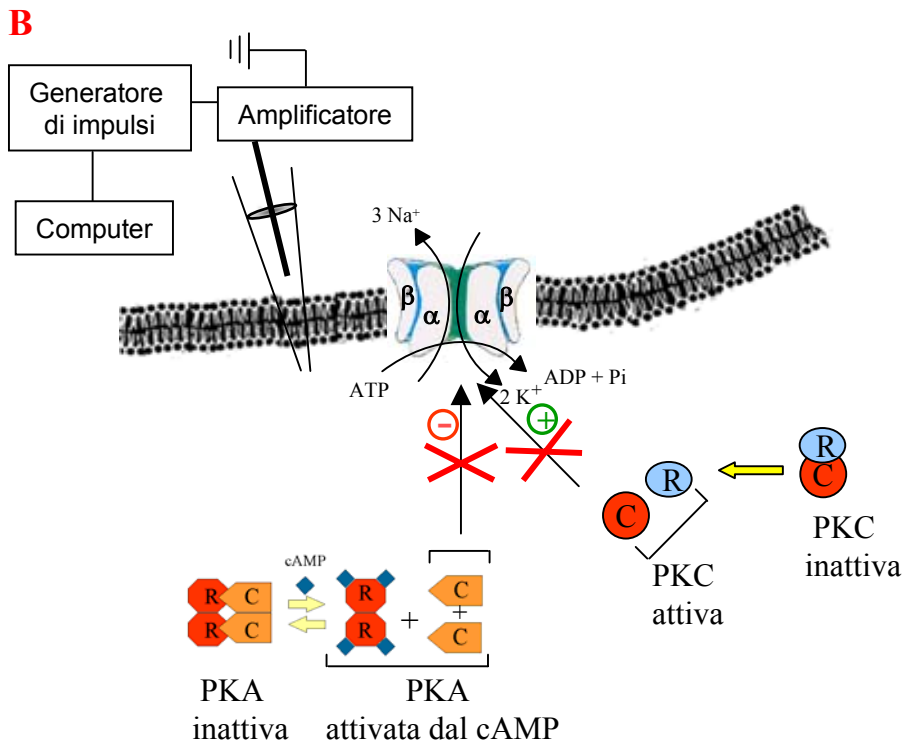
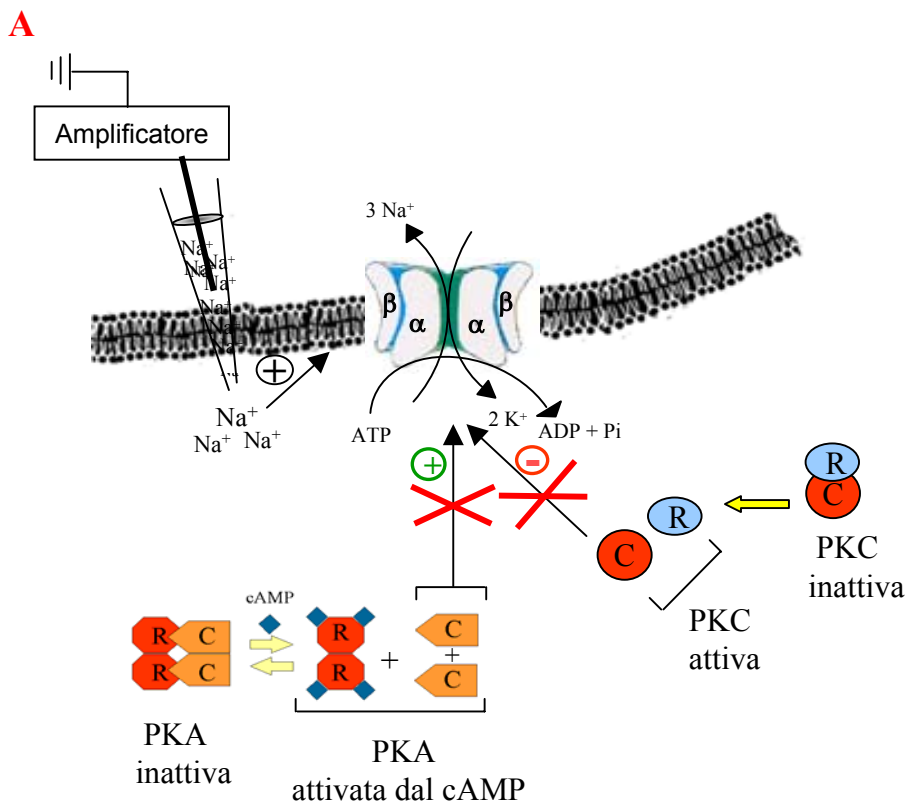


Fig. 16: **A:** Schema riassuntivo della modulazione esercitata dalle PKA e dalle PKC sull'attivazione tonica dell'enzima di membrana Na^+/K^+ -ATPasi. **B:** Schema riassuntivo della modulazione esercitata dalle PKA e dalle PKC sull'attivazione fasica dell'enzima di membrana Na^+/K^+ -ATPasi.

un'attivazione maggiore della pompa elettrogenica rispetto a quella che si ha nel controllo.

In *H. medicinalis* è stato osservato, con esperimenti di tipo elettrofisiologico, che l'ampiezza della AHP può essere modulata sia in senso positivo che in senso negativo. L'applicazione di 5HT determina, via cAMP, una netta riduzione dell'ampiezza della AHP (Belardetti, Brunelli, Demontis and Sonetti, 1984), mentre stimolazioni ripetute della cellula con treni di impulsi depolarizzanti, ad intervalli di tempo costanti, innescano una cascata molecolare Ca^{2+} -indotta che coinvolge i metaboliti derivati dalla via 5-lipoossigenasica dell'AA e che provoca un graduale incremento dell'ampiezza della AHP (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002; Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2005). Entrambe queste vie di modulazione hanno come bersaglio finale la Na^+/K^+ -ATPasi: nel primo caso, la sua attività viene modulata negativamente, nel secondo, positivamente. Ancora non è chiaro se tali modificazioni nell'attività della pompa siano indotte in maniera diretta o indiretta.

Recentemente, andando ad analizzare l'entità della connessione sinaptica tra una cellula T e un neurone *follower* è stato evidenziato che la modulazione dell'ampiezza della AHP determina una modulazione della forza sinaptica tra le due cellule: la riduzione dell'ampiezza della AHP che si ha nell'elemento presinaptico, provoca un aumento dell'ampiezza del potenziale sinaptico nel neurone *follower*; viceversa, l'aumento dell'ampiezza della AHP nell'elemento presinaptico, determina una riduzione dell'ampiezza del potenziale sinaptico (Scuri, Mozzachiodi and Brunelli, 2002; Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*). Poiché l'ampiezza della AHP dipende dall'attività della Na^+/K^+ -ATPasi, questi dati suggeriscono che, nella sanguisuga *H. medicinalis*, la pompa può giocare un fondamentale ruolo in forme di plasticità sinaptica.

I risultati di questa tesi, quindi, forniscono ulteriori evidenze sperimentali che confermano l'importanza che PKA e PKC hanno in fenomeni di plasticità sinaptica. Il coinvolgimento di queste due famiglie di protein chinasi in meccanismi di plasticità sinaptica è stato evidenziato in molti studi condotti su diversi modelli sperimentali.

Nel mollusco marino *Aplysia*, a livello della sinapsi sensori-motoria del riflesso di retrazione della branchia e del sifone, la 5HT, via cAMP, determina facilitazione a

breve termine inducendo processi di fosforilazione da parte delle PKA (Byrne and Kandel, 1996). Come precedentemente accennato, anche in *H. medicinalis*, la 5HT, determinando un aumento della concentrazione intracellulare di cAMP, è in grado di indurre fenomeni di plasticità; in particolare, l'applicazione di questo neurotrasmettitore svolge un'azione inibitoria sulla Na^+/K^+ -ATPasi che si traduce nella riduzione dell'ampiezza della AHP e, come recentemente dimostrato, in una modulazione dell'efficacia sinaptica delle cellule T (Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori and Brunelli, *submitted*). In questa tesi, dopo aver osservato che le PKA modulano in senso inibitorio l'attivazione tonica della pompa, ci è sembrato interessante condurre esperimenti per capire se, nella modulazione negativa svolta dalla 5HT, via cAMP, venissero attivate le PKA. I risultati ottenuti da questi esperimenti hanno suggerito che la 5HT non attiva la via delle PKA: durante l'iniezione intracellulare di Na^+ , infatti, cellule T preincubate con l'inibitore delle PKA Rp-8-Br-cAMPS e poi perfuse con 5HT o 8-Br-cAMP (analogo permeabile del cAMP) mostrano una depolarizzazione del V_m del tutto simile a quella che si ottiene in cellule trattate soltanto con 5HT o 8-Br-cAMP (Catarsi and Brunelli, 1991; Catarsi, Scuri and Brunelli, 1993).

Oltre che in *Aplysia*, dove le PKA e le PKC sembrano rivestire un ruolo critico nell'istaurarsi della "memoria a intermedio termine" (Ghirardi, Montarolo and Kandel, 1995), il ruolo centrale di PKA e PKC nei meccanismi molecolari che sottostanno a fenomeni di plasticità sinaptica alla base dell'apprendimento è stato messo in evidenza anche in numerosi altri modelli sperimentali. Per esempio, in *Apis mellifera*, le PKA contribuiscono a indurre memoria a lungo termine (Fiala, Müller and Menzel, 1999); ancora, in *Drosophila melanogaster*, le PKC sono coinvolte in meccanismi di memorizzazione a breve termine (Kane, Robichon, Dickinson and Greenspan, 1997).

Evidenze sperimentali di modulazione dell'attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi da parte di PKA e di PKC sono state ottenute da studi condotti su modelli cellulari non di tipo nervoso. Nel tubo collettore del rene di ratto, le PKA pare che inibiscano la pompa di membrana (Satoh, Cohen and Katz, 1993); mentre nei tubuli prossimali del rene, le PKC regolano l'attività della pompa (Ominato, Satho and Katz, 1996). Nei miociti ventricolari della cavia, si ha un aumento del trasporto cationico da parte

della Na^+/K^+ -ATPasi indotto dalla cascata cAMP/PKA (Kockskämper, Erlenkamp and Glitsch, 2000).

Dai risultati di questa tesi, invece, emerge che, in *H. medicinalis*, sia le PKA che le PKC modulano l'attività della pompa di membrana in cellule nervose sensoriali.

Tali dati sono stati ottenuti con esperimenti di tipo elettrofisiologico che consentono una valutazione indiretta dell'attività della pompa. Le protein chinasi sono fattori intracellulari coinvolti in vie di trasduzione del segnale che regolano molti meccanismi cellulari, per cui potrebbero avere numerosi *targets* di membrana oltre alla pompa elettrogenica. È possibile allora che esse agiscano anche su altri elementi della membrana cellulare. I nostri risultati, tuttavia, non rilevano nelle cellule T variazioni statisticamente significative nei valori di R_m . Sia le PKA che le PKC dunque, in queste condizioni sperimentali, pare che non vadano ad agire sulle conduttanze ioniche di membrana.

Negli esperimenti di iniezione di Na^+ , invece, i valori di R_m non sono stati rilevati per non andare ad alterare le condizioni elettrofisiologiche della cellula e l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi. Infatti, per misurare questo parametro è necessaria l'iniezione intracellulare di impulsi di corrente che attivano la cellula e ne possono modificare la risposta all'iniezione di Na^+ .

Quale potrebbe essere il ruolo funzionale dell'azione di PKA e PKC sull'attività della Na^+/K^+ -ATPasi nelle cellule T di *H. medicinalis*?

È necessario a questo proposito fare riferimento a quei meccanismi dell'attività della pompa di membrana, e quindi, di modulazione dell'ampiezza della AHP, messi in evidenza nelle cellule T e precedentemente descritti.

In questi neuroni, il neurotrasmettitore endogeno 5HT, coinvolto in forme di apprendimento non associativo (Zaccardi, Traina, Cataldo and Brunelli, 2004; Burrell and Sahley, 2005), ha un'azione modulatoria negativa sull'attività della Na^+/K^+ -ATPasi dei neuroni T che si traduce, a livello elettrofisiologico, in una netta riduzione dell'ampiezza della AHP e, a livello dell'integrazione dell'attività neuronale, in un rafforzamento della connessione sinaptica tra la cellula T e un suo neurone *follower*. Dai risultati ottenuti, le PKA non sembrano coinvolte nel meccanismo intracellulare di azione della 5HT. Tuttavia, quando la cellula è stimolata con treni di impulsi depolarizzanti capaci di indurre una AHP, le PKA

sembrano facilitare l'attività della pompa elettrogenica con conseguente incremento dell'ampiezza della AHP. L'azione delle PKA sembrerebbe allora contrastare l'azione indotta da un fattore extracellulare quale la 5HT.

Le PKC, invece, potrebbero essere coinvolte nella cascata intracellulare che porta ad un aumento dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi, e al conseguente incremento dell'ampiezza della AHP, quando la cellula è stimolata ripetutamente con treni di impulsi depolarizzanti ad intervalli costanti di tempo. In questo caso, il *trigger* molecolare è rappresentato dal Ca^{2+} che innesca una via di trasduzione del segnale in cui sono coinvolti i metaboliti della via 5-lipooossigenasica dell'AA.

Il Ca^{2+} potrebbe attivare anche le PKC che, come risulta dagli esperimenti condotti in questa tesi, hanno invece un'azione modulatoria negativa sull'attività della Na^+/K^+ -ATPasi.

In conclusione, è possibile ipotizzare che sia le PKA che le PKC rappresentano una sorta di “freno intracellulare” all'attivazione della Na^+/K^+ -ATPasi indotta da meccanismi extracellulari, quali l'applicazione di 5HT e la stimolazione intracellulare ripetuta. Questo “effetto frenante”, che si esplica sulla modulazione dell'ampiezza della AHP, andrebbe quindi a modulare la connessione sinaptica tra la cellula T e il suo *follower*.

Le PKA e le PKC, dunque, possono avere un ruolo fondamentale nei meccanismi che stanno alla base di forme di plasticità sinaptica nei neuroni T di *H. medicinalis*.

CONCLUSIONI

Dai risultati di questa ricerca emerge che le PKA e le PKC sono coinvolte in meccanismi di plasticità sinaptica nei neuroni sensoriali T della sanguisuga *H. medicinalis*.

Entrambe queste famiglie di protein chinasi, infatti, sono in grado di modulare l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi che, in questi neuroni, è la principale componente responsabile della AHP. La modulazione dell'attività della pompa si traduce, a livello elettrofisiologico, nella modulazione dell'ampiezza della AHP; variazioni nell'ampiezza della AHP influenzano la forza della connessione sinaptica tra una cellula T e un suo neurone *follower*.

Gli esperimenti descritti in questa tesi sperimentale hanno messo in evidenza che PKA e PKC hanno azioni antagoniste sull'attività della Na^+/K^+ -ATPasi e diverse a seconda dello stimolo che attiva la pompa di membrana.

I risultati ottenuti aprono nuove prospettive sperimentali.

Sia l'applicazione di 5HT che di cAMP produce inibizione della Na^+/K^+ -ATPasi e le PKA sembrano non essere coinvolte nella cascata molecolare di questo effetto. Si potrebbe allora ipotizzare che il cAMP vada a influenzare dei canali ionici del Ca^{2+} con successiva attivazione delle PKC. Partendo da questa ipotesi, in futuro, potranno essere condotti esperimenti di attivazione fasica della Na^+/K^+ -ATPasi in presenza di 5HT (che sappiamo agire via cAMP) e cheleritina allo scopo di chiarire un eventuale ruolo delle PKC nell'azione della 5HT sulla pompa di membrana.

Come già precedentemente descritto, modulazioni dell'ampiezza della AHP, legate alla modulazione dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi, influenzano la forza della connessione sinaptica fra una cellula T e un neurone *follower*. Questo evento cellulare, a livello funzionale, si potrebbe tradurre in modificazioni di atti comportamentali che rappresentano la base di forme di apprendimento non associativo che vedono il coinvolgimento proprio dei neuroni sensoriali T.

Uno di questi atti comportamentali è l'induzione al nuoto con lievi stimoli elettrici che attivano selettivamente le cellule T, ampiamente studiato nei nostri laboratori.

Perciò, sanguisughe opportunamente operate per essere utilizzate in esperimenti di *behaviour*, e trattate con inibitori di PKA e PKC, quando sottoposte a sedute di

abitudine e/o sensitizzazione, potranno mostrare se la modulazione dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi sia in grado di influenzare queste forme di apprendimento.

Sempre utilizzando l'induzione al nuoto potrà essere studiato anche l'eventuale ruolo di PKA e PKC nell'apprendimento a lungo termine, poiché già in altri modelli sperimentali è stato individuato un ruolo chiave di queste protein chinasi nella formazione di engrammi a lungo termine.

BIBLIOGRAFIA

ACKLIN, S.E. "Electrical Properties and Anion Permeability of doubly rectifying junctions in the leech central nervous system". J. Exp. Biol., **137**: 1-11 (1988).

BACCUS, S.A. "Synaptic facilitation by reflected action potentials: enhancement of transmission when nerve impulses reverse direction at axon branch points". P.N.A.S., USA, **95** (14): 8345-50 (1998).

BAYLOR, D.A. and NICHOLLS, J.G. "Chemical and electrical synaptic connexions between cutaneous mechanoreceptor neurones in the central nervous system of the leech". J. Physiol., **203**: 591-609 (1969a).

BAYLOR, D.A. and NICHOLLS, J.G. "After effects of nerve impulse on signalling in the central nervous system of the leech". J. Physiol., **203**: 571-89 (1969b).

BEAUMONT, V., ZHONG, N., FROEMKE, R.C., BALL, R.W. and ZUCKER, R.S. "Temporal synaptic tagging by I_h activation and actin: involvement in long-term facilitation and cAMP-induced synaptic enhancement". Neuron, **33**: 601-13 (2002).

BELARDETTI, F., BRUNELLI, M., DEMONTIS, G.C. and SONETTI, D. "Role of serotonin and cAMP on facilitation of the fast conducting system of the leech". Brain Res., **300**: 91-102 (1984).

BRUNELLI, M., CASTELLUCCI, V.F. and KANDEL, E.R. "Synaptic facilitation and behavioural sensitization in *Aplysia*: a possible role of serotonin and cAMP". Science, **1974**: 1178-81 (1976).

BURREL, B.D. and SAHLEY, C.L. "Serotonin mediates learning-induced potentiation of excitability". J. Neurophysiol., **94** (6): 4002-10 (2005).

BYRNE, J.H. and KANDEL, R. "Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence". J. Neurosci., **16** (2): 425-35 (1996).

CATALDO, E., BRUNELLI, M., BYRNE, J.H., AV-RON, E., CAI, Y. and BAXTER, D.A. "Computational model of touch sensory cells (T cells) of the leech: role of the afterhyperpolarization (AHP) in activity-dependent conduction failure". J. Comp. Neurosci., **18**: 5-24 (2005).

CATARSI, S. and BRUNELLI, M. "Serotonin depresses the after-hyperpolarization through the inhibition of the Na^+/K^+ electrogenic pump in the sensory neurones of the leech". J. Exp. Biol., **155**: 261-73 (1991).

CATARSI, S., SCURI, R. and BRUNELLI, M. "Cyclic AMP mediates inhibition of the Na^+/K^+ electrogenic pump by serotonin in tactile sensory neurons of the leech". J. Physiol., **462**: 229-42 (1993).

COGGESHALL, R.E. and FAWCETT, D.W. "The fine structure of the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*". J. Neurophysiol., **27**: 229-89 (1964).

COLOMBAIONI, L. and BRUNELLI, M. "Neurotransmitter-induced modulation of an electrotonic synapse in the central nervous system of *Hirudo medicinalis*". Exp. Biol., **47**: 139-44 (1988).

COROTTO, F.S. and MICHEL, W.C. "Mechanisms of afterhyperpolarization in lobster olfactory receptor neurons". J. Neurophysiol., **80** (3): 1268-76 (1998).

DAVIES, S.P., REDDY, H., CAIVANO, M. and COHEN, P. "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors". Biochem. J., **351**: 95-105 (2000).

DEN HERTOOG, A. and RITCHIE, J.M. "A comparison of the effect of temperature, metabolic inhibitors and of ouabain on the electrogenic component of the sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibre". J. Physiol., **204** (3): 523-38 (1969).

DE VASCONCELLOS, A.P., ZUGNO, A.I., DOS SANTOS, A.H., NIETTO, F.B., CREMA, L.M., GONÇALVES, M., FRANZON, R., WYSE, A.T., DA ROCHA, E.R. and DALMAZ, C. "Na⁺,K⁺-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits". Neurobiol. Learn. Mem., **84** (2): 102-10 (2005).

DOSTMANN, W.R., TAYLOR, S.S., GENIESER, H.G., JASTORFF, B., DOSKELAND, S.O. and OGREID, D. "Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinases I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioates". J. Biol. Chem., **265** (18): 10484-91(1990).

ECKERT, R. "Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech". J. Gen. Physiol., **46**: 573-87 (1963).

FÉRAILLE, E., BEGUIN, P., CARRANZA, M.L., GONIN, S., ROUSSELOT, M., MARTIN, P.Y., FAVRE, H. and GEERING, K. "Is phosphorylation of the alpha1 subunit at Ser-16 involved in the control of Na,K-ATPase activity by phorbol ester-activated protein kinase C?". Mol. Biol. Cell, **11** (1): 39-50 (2000).

FIALA, A., MÜLLER, U. and MENZEL, R. "Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*". J. Neurosci., **19** (22): 10125-34 (1999).

FRENCH, A.S. "Ouabain selectively affects the slow component of sensory adaptation in an insect mechanoreceptor". Brain Res., **504** (1): 112-14 (1989).

GHIRARDI, M., BRAHA, O., HOCHNER, B., MONTAROLO, P.G., KANDEL, E. and DALE, N. "Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons". Neuron, **9**: 479-89 (1992).

GHIRARDI, M., MONTAROLO, P.G. and KANDEL, E.R. "A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of *Aplysia*". Neuron, **14** (2): 413-20 (1995).

GLASS, D.B., CHENG, H.C., MENDE-MULLER, L., REED, J. and WALSH, D.A. "Primary structural determinants essential for potent inhibition of cAMP-dependent protein kinase by inhibitory peptides corresponding to the active portion of the heat-stable inhibitor protein". J. Biol. Chem., **264** (15): 8802-10 (1989).

GRÜNBAUM, L. and MÜLLER, U. "Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee". J. Neurosci., **18** (11): 4384-92 (1998).

GUSTAFSSON, B. "Afterhyperpolarization and the control of repetitive firing in spinal neurones of the cat". Acta Physiol. Scand. Suppl., **416**: 1-47 (1974).

HAGIWARA, S. and MORITA, H. "Electrotonic transmission between two nerve cells in the leech ganglion". J. Neurophysiol., **25**: 721-31 (1962).

HILL, R.H., ARHEM, P. and GRILLNER, S. "Ionic mechanisms of 3 types of functionally different neurons in the lamprey spinal cord". Brain Res., **358** (1-2): 40-52 (1985).

JANSEN, J.K.S. and NICHOLLS, J.G. "Conductance changes, an electrogenic pump and the hyperpolarization of leech neurons following impulses". J. Physiol., **229**: 635-55 (1973).

KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H. and JESSEL, T.M. "Principi di neuroscienze". Casa Editrice Ambrosiana, (1994).

KANE, N.S., ROBICHON, A., DICKINSON, J.A. and GREENSPAN, R.J. "Learning without performance in PKC-deficient *Drosophila*". Neuron, **18** (2): 307-14 (1997).

KEMENES, G., KEMENES, I., MICHEL, M., PAPP, A. and MÜLLER, U. "Phase-dependent molecular requirements for memory reconsolidation: differential roles for protein synthesis and protein kinase A activity". J. Neurosci., **26** (23): 6298-302 (2006).

KERKUT, G.A. and THOMAS, R.C. "An electrogenic sodium pump in snail nerve cells". Comp. Biochem. Physiol., **14**: 167-83 (1965).

- KHABOUR, O., LEVENSON, J., LYONS, L.C., KATEGAYA, L.S., CHIN, J., BYRNE, J.H. and ESKIN, A. "Coregulation of glutamate uptake and long-term sensitization in *Aplysia*". J. Neurosci., **24** (40): 8829-37 (2004).
- KLEIN, M., CAMARDO, J. and KANDEL, E.R. "Serotonin modulates aspecific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*". P.N.A.S., USA, **79**: 5713-17 (1982).
- KOCKSKÄMPER, J., ERLenkAMP, S. and GLITSCH, H.G. "Activation of the cAMP-protein kinase A pathway facilitates Na⁺ translocation by the Na⁺-K⁺ pump in guinea-pig ventricular myocytes". J. Physiol., **523** (3): 561-74 (2000).
- KRISTAN, W.B. Jr. "The neurobiology of swimming in the leech". T.I.N.S., **6**: 84-8 (1983).
- KUFFLER, S.W. and NICHOLLS, J.G. "From neuron to brain". Sinauer Ass. Inc. Publisher, USA, (1976).
- LENT, C.M. "Retzius cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech". Science, **179**: 693-96 (1973).
- LIAO, X., GUNSTREAM, J.D., LEWIN, M.R., AMBRON, R.T. and WALTERS, E.T. "Activation of protein kinase A contributes to the expression but not the induction of long-term hyperexcitability caused by axotomy of *Aplysia* sensory neurons". J. Neurosci., **19** (4): 1247-56 (1999).
- LIU, J., HU, J.Y., SCHACHER, S. and SCHWARTZ, J.H. "The two regulatory subunits of *Aplysia* cAMP-dependent protein kinase mediate distinct functions in producing synaptic plasticity". J. Neurosci., **24** (10): 2465-74 (2004).
- LOCATELLI, R. and ROMANO, A. "Differential activity profile of cAMP-dependent protein kinase isoforms during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*". Neurobiol. Learn. Mem., **83**: 232-42 (2005).
- LOMBARDO, P., SCURI, R., CATALDO, E., CALVANI, M., NICOLAI, R., MOSCONI, L. and BRUNELLI, M. "Acetyl-L-carnitine induces a sustained potentiation of the afterhyperpolarization". Neurosci., **128**: 293-303 (2004).
- MACAGNO, E.R. "Number and distribution of neurons in the leech segmental ganglion". J. Comp. Neurol., **190**: 283-302 (1980).
- MASON, A., SUNDERLAND, A.J. and LEAKE, J.D. "Effects of the leech Rz cells on body wall muscles". Comp. Biochem. Physiol., **63** (C): 359-61 (1979).
- MORITA, K., DAVID, G., BARRETT, J.N. and BARRETT, E.F. "Posttetanic hyperpolarization produced by electrogenic Na(+)-K⁺ pump in lizard axons impaled near their motor terminals". J. Neurophysiol., **70** (5): 1874-84 (1993).

- MOZZACHIODI, R., SCURI, R., ROBERTO, M. and BRUNELLI, M. "Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa Taxifolia*, depresses after hyperpolarization in Invertebrate neurons". Neurosci., **107** (3): 519-25 (2001).
- MÜLLER, U. "Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees". Neuron, **27** (1): 159-68 (2000).
- MÜLLER, U. and CAREW, T.J. "Serotonin induces temporally and mechanistically distinct phases of persistent PKA activity in *Aplysia* sensory neurons". Neuron, **21**: 1423-34 (1998).
- MULLER, K.J. and Mc MAHAN, V.J. "The shapes of sensory and motor neurons and the distribution of their synapses in ganglia of the leech: a study using intracellular injection of horseradish peroxidase". Proc. Roy. Soc. B, **194**: 481-99 (1976).
- MULLER, K.J., NICHOLLS, J.G. and STENT, G.S. "Neurobiology of the leech". Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (1981).
- MUÑOZ-CUEVAS, J., VARA, H. and COLINO, A. "Characterization of release-independent short-term depression in the juvenile rat hippocampus". J. Physiol., **558** (2): 527-48 (2004).
- MUZZIO, I.A., GANDHI, C.C., MANYAM, U., PESNELL, A. and MATZEL, L.D. "Receptor-stimulated phospholipase A(2) liberates arachidonic acid and regulates neuronal excitability through protein kinase C". J. Neurophysiol., **85** (4): 1639-47 (2001).
- NAKAJIMA, S. and TAKAHASHI, K. "Post-tetanic hyperpolarization and electrogenic Na⁺-pump in stretch receptor neurone of crayfish". J. Physiol., **187**: 105-27 (1966).
- NICHOLLS, J.G. and PURVES, D. "Monosynaptic chemical and electrical connexions between sensory and motor cells in the central nervous system of the leech". J. Physiol., **209**: 647-67 (1970).
- OMINATO, M., SATOH, T. and KATZ, A.I. "Regulation of Na-K-ATPase activity in the proximal tubule: role of the protein kinase C pathway and of eicosanoids". J. Membr. Biol., **152** (3): 235-43 (1996).
- PARKER, D., HILL, R. and GRILLNER, S. "Electrogenic pump and a Ca(2+)-dependent K⁺ conductance contribute to a posttetanic hyperpolarization in lamprey sensory neurons". J. Neurophysiol., **76** (1): 540-53 (1996).
- PINEDA, J.C., GALLARAGA, E., BARGAS, J., CRISTANCHO, M. and ACEVES, J. "Charybdotoxin and apamine sensitivity of the calcium-dependent repolarization

and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons". J. Neurophysiol., **68** (1): 287-94 (1992).

REICH, C.G., MASON, S.E. and ALGER, B.E. "Novel form of LTD induced by transient, partial inhibition of the Na,K-pump in rat hippocampal CA1 cells". J. Neurophysiol., **91**: 239-47 (2004).

RIMON, G. and RUBIN, M. "Regulation of a common, low-affinity binding site for primary prostanoids on bovine aortic endothelial cells". Biochem. Biophys. Acta, **1380** (2): 289-96 (1998).

SAH, P. "Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation". T.I.N.S., **19** (4): 150-4 (1996).

SAH, P. and McLACHAN, E.M. "Potassium current contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons". J. Neurophysiol., **68** (5): 1834-41 (1992).

SATOH, T., COHEN, H.T. and KATZ, A.I. "Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. II. Role of eicosanoids". J. Clin. Invest., **91** (2): 409-15 (1993).

SCURI, R., MOZZACHIODI, R. and BRUNELLI, M. "Activity-dependent increase of the AHP amplitude in T sensory neurons of the leech". J. Neurophysiol., **88**: 2490-500 (2002).

SCURI, R., MOZZACHIODI, R. and BRUNELLI, M. "Role for calcium signaling and arachidonic acid metabolites in the activity-dependent increase of AHP amplitude in leech T sensory neurons". J. Neurophysiol., **94**: 1066-73 (2005).

SCURI, R., LOMBARDO, P., CATALDO, E., RISTORI, C. and BRUNELLI, M. "The inhibition of the Na⁺/K⁺-ATPase potentiates synaptic transmission in T sensory neurons of the leech". Eur. J. Neurosci., *submitted*.

STORM, J.F. "Action potential repolarization and a fast afterhyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells". J. Physiol., **385**: 733-59 (1987).

STORM, J.F. "An afterhyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells". J. Physiol., **409**: 171-90 (1989).

SUGITA, S., DOUGLAS, B. and BYRNE, J. "Modulation of a cAMP/protein kinase A by protein kinase C in sensory neurons of *Aplysia*". J. Neurosci., **17** (19): 7237-44 (1997).

SUTTON, M.A. and CAREW, T.J. "Parallel molecular pathways mediate expression of distinct forms of intermediate-term facilitation at tail sensory-motor synapses in *Aplysia*". Neuron, **26** (1): 219-31 (2000).

- SUTTON, M.A., BAGNALL, M.W., SHARMA, S.K., SHOBE, J. and CAREW, T.J. "Intermediate-term memory for site-specific sensitization in *Aplysia* is maintained by persistent activation of protein". J. Neurosci., **24** (14): 3600-09 (2004).
- TAMSE, C.T., XU, Y., SONG, H., NIE, L. and YAMOA, E.N. "Protein kinase A mediates voltage-dependent facilitation of Ca^{2+} current in presynaptic hair cells in *Hermisenda crassicornis*". J. Neurophysiol., **89**: 1718-26 (2003).
- TOBIN, A.E. and CALABRESE, R.L. "Myomodulin increase I_h and inhibits the Na/K pump to modulate bursting in leech heart interneurons". J. Neurophysiol., **94**: 3938-50 (2005).
- VAN ESSEN, D.C. "The contribution of membrane hyperpolarization to adaptation and conduction block in sensory neurones of the leech". J. Physiol., **230**: 509-34 (1973).
- WEEBER, E.J., ATKINS, C.M., SELCHER, J.C., VARGA, A.W., MIRNIKJOO, B., PAYLOR, R., LEITGES, M. and SWEATT, J.D. "A role for the beta isoform of protein kinase C in fear conditioning". J. Neurosci., **20** (16): 5906-14 (2000).
- WILLIAMSON, A. and ALGER, B.E. "Characterization of an early afterhyperpolarization after a brief train of action potentials in rat hippocampal neurons in vitro". J. Neurophysiol., **63** (1): 72-81 (1990).
- WYSE, A.T.S., BAVARESCO, C.S., REIS, E.A., ZUGNO, A.I., TAGLIARI, B., CALCAGNOTTO, T. and NETTO, C.A. "Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na^+, K^+ -ATPase activity in rat hippocampus". Physiol. Behav., **80**: 475-79 (2004).
- WOLFE, S.L. "Biologia molecolare e cellulare". EdiSES, (1995).
- YAU, K.W. "Receptive fields, and conduction block of sensory neurons in the central nervous system of the leech". J. Physiol., **263**: 513-38 (1976).
- ZACCARDI, M.L., TRAINA, G., CATALDO, E. and BRUNELLI, M. "Sensitization and dishabituation of swim induction in the leech *Hirudo medicinalis*: role of serotonin and cyclic AMP". Behav. Brain Res., **153** (2):317-26 (2004).
- ZHAN, H., TADA, T., NAKAZATO, F., TANAKA, Y. and HONGO, K. "Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain". Neurol. Res., **26**: 35-40 (2004).